

# **Aktivitätsabhängige Entwicklung der Struktur und Kinetik inhibitorischer Eingänge zu auditorischen Neuronen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von  
**Christoph Kapfer**

München, im November 2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Neurobiologie, Arbeitsgruppe Auditorische Physiologie (Martinsried, Deutschland) durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Benedikt Grothe
2. Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Neuweiler

eingereicht am 24.11.2003

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2004

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>8</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>11</b>
2.1	Der auditorische Hirnstamm .....	11
2.2	Funktion und Physiologie der medialen oberen Olive.....	12
2.2.1	Zeitverarbeitung im Kontext von Schalllokalisation im Azimut .....	12
2.2.2	Afferenzen und Efferenzen der medialen oberen Olive .....	15
2.2.3	Mechanismen der ITD-Verarbeitung in der MSO .....	19
2.2.3.1	Ortscode der ITD-Verarbeitung durch Kreuzkorrelation.....	20
2.2.3.2	Populationscode der ITD-Verarbeitung in Säugetieren durch zeitlich präzise Inhibition .....	21
2.2.3.3	Rolle der Inhibition bei der Verarbeitung von ITDs in der MSO der Wüstenrennmaus .....	23
2.3	Die Wüstenrennmaus als Tiermodell zur Untersuchung von Schalllokalisationsmechanismen im tieffrequenten Bereich .....	26
2.4	Räumliche Differenzierung inhibitorischer Eingänge .....	27
2.5	Ziel der Arbeit .....	29
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>34</b>
3.1	Immunhistochemische Methoden .....	34
3.1.1	Unilaterale Cochleaentnahme.....	34
3.1.2	Immunhistochemische Färbungen.....	35
3.1.2.1	Glycin Immunhistochemie (Glycin – IHC) .....	36
3.1.2.1.1	Doppel – Immunfluoreszenz – Histochemie Glycin und MAP2 .....	36
3.1.2.1.2	Glycin – IHC mit Di-amino-benzidin (DAB) als Chromogen.....	37
3.1.2.1.2.1	Glycin – DAB – Färbung an Gefrierschnitten .....	37
3.1.2.1.2.2	Glycin – DAB – Färbung an Vibratomschnitten .....	37
3.1.2.2	Glycinrezeptor Immunhistochemie (Glycinrezeptor – IHC) .....	39
3.1.2.2.1	Doppel – Immunfluoreszenz – Histochemie Glycinrezeptor und MAP2.....	39
3.1.2.2.2	Glycinrezeptor – IHC mit Di-amino-benzidin (DAB) als Chromogen .....	40
3.1.2.3	Gephyrin Immunhistochemie (Gephyrin – IHC) .....	41
3.1.2.3.1	Einfach – Immunfluoreszenz – Histochemie Gephyrin .....	41
3.1.2.3.2	Gephyrin – IHC mit Di-amino-benzidin (DAB) als Chromogen .....	42
3.1.2.3.2.1	Gephyrin – DAB – Färbung an Gefrierschnitten .....	42
3.1.2.3.2.2	Gephyrin – DAB – Färbung an Vibratomschnitten .....	42
3.1.2.3.3	Gephyrin Immun – Elektronenmikroskopie (EM) .....	43

3.1.2.4 Immunhistochemischer Nachweis der mit Neurobiotin gefüllten Zellen aus den <i>in vitro</i> Experimenten.....	45
<b>3.1.3 Mikroskopische Analyse der immunhistochemischen Färbungen.....</b>	<b>46</b>
3.1.3.1 Lichtmikroskopische Analyse von fluoreszent markiertem Gewebe.....	46
3.1.3.2 Lichtmikroskopische Analyse von DAB-markiertem Gewebe.....	48
3.1.3.3 Elektronenmikroskopische Analyse .....	49
<b>3.1.4 Quantifizierung der Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Zellen der Wüstenrennmaus.....</b>	<b>49</b>
3.1.4.1 Quantifizierung der Verteilung Glycin- und Gephyrin-positiver Punkta auf einzelnen MSO-Neuronen .....	49
3.1.4.2 Quantifizierung der Verteilung von Glycinrezeptorclustern an einzelnen MSO-Neuronen .....	51
3.1.4.3 Quantifizierung der Verteilung Gephyrin-positiver Punkta im Gesamtkernbereich der MSO .....	53
3.1.4.4 Quantifizierung der Verteilung Glycin-positiver Punkta im Gesamtkernbereich der MSO .....	55
3.1.4.5 Quantifizierung der Verteilung von Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO .....	58
3.1.4.6 Statistische Analyse und graphische Darstellung der Quantifizierungen .....	62
<b>3.2 Methoden der <i>in vitro</i> Elektrophysiologie .....</b>	<b>63</b>
3.2.1 Anfertigen der Hirnschnitte .....	63
3.2.2 Aufbau der <i>in vitro</i> Versuchsaapparatur.....	65
3.2.3 Identifizierung der MSO in den <i>in vitro</i> Experimenten .....	65
3.2.4 Verwendete Lösungen und Pharmaka .....	66
3.2.4.1 Zusammensetzung der verwendeten artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeiten .....	66
3.2.4.2 Zusammensetzung der verwendeten internen Elektrodenlösungen.....	67
3.2.4.3 Verwendete Pharmaka.....	70
3.2.5 Elektrophysiologie .....	71
3.2.6 Analyse der elektrophysiologischen Daten .....	75
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>78</b>
<b>4.1 Immunhistochemische Charakterisierung der Entwicklung glycinерger Eingänge zu Neuronen der medialen oberen Olive.....</b>	<b>78</b>
4.1.1 Allgemeine Anatomie des SOC's bei der Wüstenrennmaus .....	78
4.1.2 Verteilung inhibitorischer glycinерger Eingänge an MSO-Neuronen bei adulten und jungen Wüstenrennmäusen .....	80
4.1.3 Erfahrungsabhängige Entwicklung der räumlich beschränkten glycinерgen Eingänge zu MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus .....	85



<b>4.1.4 Quantifizierung der Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen adulter, junger und unilateral vertäubter Wüstenrennmäuse .....</b>	<b>89</b>
4.1.4.1 Quantifizierung der Verteilung von präsynaptischem Glycin .....	89
4.1.4.2 Quantifizierung der Verteilung des postsynaptischen Ankerproteins Gephyrin.....	94
4.1.4.3 Quantifizierung der Verteilung von postsynaptischen Glycinrezeptoren .....	97
<b>4.1.5 Immun – Elektronenmikroskopische Untersuchung der MSO der Wüstenrennmaus .....</b>	<b>100</b>
4.1.5.1 Ultrastruktur der MSO bei adulten und jungen Wüstenrennmäusen .....	100
4.1.5.2 Verteilung von elektronenmikroskopisch identifizierten, inhibitorischen Synapsen an MSO-Neuronen der adulten und jungen Wüstenrennmaus.....	105
<b>4.2 Verteilung von inhibitorischen, glycinergen Synapsen an Neuronen der lateralen oberen Olive (LSO) und des superioren periolivären Nucleus (SPN) .....</b>	<b>108</b>
<b>4.3 Verteilung inhibitorischer, glycinерger Eingänge an MSO-Neuronen bei adulten und jungen Ratten.....</b>	<b>110</b>
4.3.1 Generelle Aspekte der MSO-Anatomie bei der Ratte .....	110
4.3.2 Verteilung von inhibitorischen glycinergen Eingängen an MSO-Neuronen bei adulten und jungen Ratten .....	113
<b>4.3.3 Quantifizierung der Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen adulter und junger Ratten.....</b>	<b>117</b>
4.3.3.1 Quantifizierung der Verteilung von präsynaptischem Glycin an MSO-Neuronen der adulten Ratte .....	117
4.3.3.2 Quantifizierung der Verteilung von postsynaptischem Gephyrin an MSO-Neuronen der jungen und adulten Ratte.....	118
<b>4.3.4 Immun – Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ratten-MSO .....</b>	<b>122</b>
4.3.4.1 Ultrastruktur der MSO bei der adulten und jungen Ratte .....	122
4.3.4.2 Verteilung von elektronenmikroskopisch identifizierten inhibitorischen Synapsen an MSO-Neuronen der adulten und jungen Ratte.....	125
<b>4.4 Elektrophysiologische Charakterisierung der Entwicklung inhibitorischer, glycinерger Eingänge zu Neuronen der MSO in der Wüstenrennmaus .....</b>	<b>127</b>
4.4.1 Einteilung der Neurone nach ihrer Anatomie und Lage innerhalb der MSO.....	127
<b>4.4.2 Entwicklung der intrinsischen Eigenschaften der MSO-Neurone nach Hörbeginn .....</b>	<b>129</b>
4.4.2.1 Ruhemembranpotential und passive Membrankapazität .....	129
4.4.2.2 Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante .....	131
4.4.2.3 Strom – Spannungsbeziehung (I / V – Kurven).....	134

4.4.3	Entwicklungsabhängige Veränderungen im Zeitverhalten der synaptisch evozierten, inhibitorischen Potentiale und Ströme.....	140
4.4.3.1	Inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs).....	141
4.4.3.2	Inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSC).....	147
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>153</b>
<b>5.1</b>	<b>Anmerkungen zu den Methoden.....</b>	<b>153</b>
5.1.1	Immunhistochemie.....	153
5.1.1.1	Der Glycinrezeptorkomplex und mögliche Interaktionen mit GABA.....	156
5.1.2	Elektrophysiologie .....	161
<b>5.2</b>	<b>Räumliche Beschränkung der glycinergen Eingänge .....</b>	<b>162</b>
5.2.1	Verteilung glycinерger Eingänge in der MSO, der LSO und dem SPN adulter Wüstenrennmäuse.....	162
5.2.2	Säugetiere mit einem auf die Analyse tiefer Frequenzen spezialisierten Hörsystem.....	170
5.2.3	Säugetiere mit einem eher hochfrequent abgestimmten Hörsystem.....	174
5.2.4	Funktionelle Auswirkungen einer räumlich beschränkten Inhibition auf die ITD-Verarbeitung .....	181
<b>5.3</b>	<b>Entwicklung der räumlichen Beschränkung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen.....</b>	<b>191</b>
5.3.1	Erfahrungsabhängigkeit der Entwicklung .....	191
5.3.2	Mögliche zelluläre Mechanismen der erfahrungsabhängigen Entwicklung .....	200
<b>5.4</b>	<b>Entwicklung der intrinsischen und synaptischen Eigenschaften von MSO-Neuronen.....</b>	<b>210</b>
5.4.1	Entwicklung der intrinsischen Membraneigenschaften von MSO-Neuronen.....	210
5.4.2	Entwicklung des Zeitverhaltens glycinерger Synapsen bei MSO-Neuronen.....	217
<b>5.5</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick.....</b>	<b>226</b>
<b>6</b>	<b>Anhang zu Material und Methoden .....</b>	<b>228</b>
<b>6.1</b>	<b>Arbeitsprotokolle der immunhistochemischen Färbungen .....</b>	<b>228</b>
6.1.1	Allgemeine Hinweise zu der Präparation und zu den Färbungen .....	228
6.1.1.1	Betäubung der Tiere.....	228
6.1.1.2	Perfusion.....	228
6.1.1.3	Präparation des fixierten Gehirns .....	228

6.1.1.4	Anfertigen der Schnitte.....	228
6.1.1.5	Immunhistochemische Färbungen.....	229
6.1.1.5.1	Allgemeine Hinweise zur Behandlung von Antikörpern.....	229
6.1.1.5.2	Arbeiten mit Triton x 100 oder anderen Tensiden .....	229
6.1.1.5.3	Kontrolle der Spezifität einer Antikörperfärbung .....	230
6.1.1.5.4	Behandlung von Fluoreszenz .....	230
6.1.1.5.5	Hinweise zur Objektträgerfärbung .....	231
6.1.2	Protokoll Glycin – MAP2-Färbung (Gefrierschnitte) [Fluoreszenz-Doppelfärbung oder DAB-Färbung] .....	231
6.1.3	Protokoll Glycinrezeptor – MAP2-Färbung (Gefrierschnitte) [Fluoreszenz-Doppelfärbung oder DAB-Färbung].....	236
6.1.4	Protokoll Gephyrinfärbung (Gefrierschnitte) [Fluoreszenz- oder DAB-Färbung mit Signalamplifikation] .....	241
6.1.5	Protokoll Gephyrinfärbung (Vibratomschnitte) [DAB-Färbung] .....	248
6.1.6	Protokoll Gephyrin Immunhistochemie für die Elektronenmikroskopie .....	252
6.1.7	Protokoll Glycinfärbung (Vibratomschnitte) [DAB-Färbung] .....	258
6.1.8	Protokoll MAP2-Färbung (Gefrierschnitte) [Fluoreszenz- oder DAB-Färbung] .....	262
6.1.9	Protokoll Neurobiotin-Färbung [Fluoreszenz- oder DAB-Färbung] .....	267
6.2	Liste der verwendeten Reagenzien .....	271
6.2.1	Allgemeine Chemikalien .....	271
6.2.2	Standardpuffer für die Immunhistochemie.....	272
6.2.3	Sonstige Reagenzien und Verbrauchsmittel .....	272
6.2.4	Fixiermittel .....	272
6.2.5	Spezielle Chemikalien für die <i>in vitro</i> Elektrophysiologie .....	273
6.2.6	Liste der Pharmaka für die <i>in vitro</i> Elektrophysiologie .....	273
7	Liste der Abkürzungen und Begriffe.....	274
8	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	279
9	Literaturverzeichnis.....	282
10	Danksagung .....	318
11	Lebenslauf.....	319
12	Erklärung .....	320

# 1 Zusammenfassung

Die geordnete räumliche Anordnung von erregenden und hemmenden Eingängen an einzelnen Neuronen wird im allgemeinen als eine Grundvoraussetzung für eine zeitlich genaue Verarbeitung von Signalen angesehen. Im auditorischen System von Säugetieren findet sich ein neuronaler Schaltkreis, der im Kontext von Schalllokalisation im Azimut eine extrem hohe zeitliche Auflösung benötigt. Die Neurone der medialen oberen Olive (MSO) sind in der Lage Ankunftszeitunterschiede tieffrequenter Schalle zwischen den beiden Ohren im Bereich von weniger als 50 Mikrosekunden aufzulösen. Wie jüngst in der Wüstenrennmaus gezeigt werden konnte, beruht dabei der Mechanismus, welcher der Analyse dieser interauralen Zeitdifferenzen (ITDs) zugrundeliegt, neben einer Koinzidenz binaural erregender Eingänge vor allem auf der Wirkung einer phasengekoppelten glycinergen Inhibition. Diese Inhibition muss zeitlich präzise mit der Erregung von beiden Ohren interagieren um die in MSO-Neuronen beobachtete ITD-Sensitivität zu erzeugen. Die glycinerge Inhibition benötigt dafür eine sehr schnelle Kinetik, die ebenfalls nur im Bereich hunderter Mikrosekunden liegt. Bei MSO-Neuronen der adulten Katze und des adulten Chinchillas, beides ITD-nutzende Säugetiere mit gut entwickeltem tieffrequentem Hören, sind diese inhibitorischen Eingänge auf die Zellkörper beschränkt. Dies wirft die Frage auf, ob die Entwicklung einer spezifischen räumlichen Anordnung der glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen mit der Funktion der Zellen in der ITD-Verarbeitung in Zusammenhang steht und ob diese zur notwendigen schnellen Kinetik der Inhibition beiträgt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mit immunhistochemischen Methoden die räumliche Verteilung glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen adulter, junger (zwei Tage vor Hörbeginn) und adulter aber vor Hörbeginn einseitig vertäubarer Wüstenrennmäuse (UCA) qualitativ und quantitativ bestimmt. Daneben wurde bei adulten Wüstenrennmäusen die räumliche Verteilung glycinergen Eingänge zu Neuronen der lateralen oberen Olive (LSO) und des superioren periolivären Nucleus (SPN), beides Nuclei des auditorischen Stammhirns die eine geringere Zeitauflösung zeigen, qualitativ untersucht. Desweiteren wurde die räumliche Verteilung glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen bei adulten und jungen (zwei Tage vor Hörbeginn) Ratten qualitativ und quantitativ bestimmt. Die Ratte dient in diesem Zusammenhang als Beispiel eines Säugetiers, welches nicht auf die Analyse tiefer Frequenzen spezialisiert ist und daher höchstwahrscheinlich auch keine ITDs zur Schalllokalisation nutzt.

Bei MSO-Neuronen adulter Wüstenrennmäuse zeigten sowohl präsynaptische glycinerge Boutons, als auch postsynaptische Glycinrezeptor- und Gephyrincluster

(Ankerprotein des Glycinrezeptors) eine räumliche Beschränkung auf die Somata und die extrem proximalen Dendriten. Diese räumliche Differenzierung der glycinergen Eingänge konnte bei MSO-Neuronen junger Wüstenrennmäuse, zwei Tage vor Beginn des Hörens von Luftschall, nicht beobachtet werden. Eine Monauralisierung der Eingänge zu MSO-Neuronen bei UCA-Wüstenrennmäusen verhinderte die Entwicklung dieser räumlichen Beschränkung der glycinergen Eingänge. Sowohl bei jungen, als auch bei UCA-Tieren, verteilten sich die Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes gleichmäßig über Somata und gesamte Dendriten. Im Unterschied zu MSO-Neuronen, konnte bei LSO- und SPN-Neuronen in adulten Wüstenrennmäusen keine räumliche Beschränkung der glycinergen Eingänge auf die Somaregion festgestellt werden. Auch die glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen der adulten und jungen Ratte zeigten keine räumliche Beschränkung, sondern verteilten sich gleichmäßig über Somata und Dendriten. Diese Ergebnisse weisen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer räumlichen Beschränkung inhibitorischer Eingänge und der Funktion der MSO-Neurone bei der ITD-Verarbeitung in tieffrequent hörenden Tieren hin. Wie aus den MSO-Daten der Wüstenrennmäuse abgeleitet werden kann, scheint der Entwicklung dieser räumlichen Differenzierung ein aktivitäts- oder erfahrungsabhängiger Prozess zugrundezuliegen, welcher zumindest eine binaurale akustische Stimulation erfordert.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde mittels intrazellulärer Ableitungen nach der Ganzzell-Membranleck-Technik („whole-cell patch-clamp technique“) der *in vitro* Elektrophysiologie an Hirnschnitten die Entwicklung der biophysikalischen Membraneigenschaften und der Kinetik evozierter inhibitorischer postsynaptischer Potentiale (IPSP) und Ströme (IPSC) bei MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus nach Hörbeginn untersucht.

Innerhalb der ersten zwei Tage nach Hörbeginn zeigten die biophysikalischen Membraneigenschaften der MSO-Neurone eine altersabhängige Verringerung des Eingangswiderstandes und der passiven Membranzeitkonstante, sowie eine deutliche Reifung der spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten für Natrium- und Kaliumionen. Diese Entwicklung schneller Membraneigenschaften deutet darauf hin, dass die MSO-Neurone der Wüstenrennmaus bereits kurz nach Hörbeginn in der Lage sind, die zur ITD-Auswertung funktionell notwendige Phasenkopplung zu leisten. In der Entwicklung der kinetischen Eigenschaften der IPSPs / IPSCs konnte in einem Zeitraum von zwei bis fünf Tagen nach Hörbeginn ein Trend hin zu einer schnelleren Kinetik mit zunehmendem Alter festgestellt werden. Dabei zeigten einige MSO-Neurone eine IPSC-Kinetik im Bereich von nicht mehr als hundert von Mikrosekunden. Eine Kinetik, wie sie bisher für

inhibitorische Ströme noch nicht gezeigt werden konnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass MSO-Neurone der Wüstenrennmaus die zur ITD-Auswertung notwendige Kinetik der Inhibition aufweisen können. Wie der zeitliche Verlauf nahelegt, scheint diese Entwicklung von der Entwicklung einer räumlichen Beschränkung der glycinergen Eingänge abzuhängen.

Teile der unter Kapitel 4.1 dargestellten Ergebnisse sind veröffentlicht in

Kapfer C, Seidl AH, Schweizer H, Grothe B (2002) Experience-dependent refinement of inhibitory inputs to auditory coincidence-detector neurons. *Nat Neurosci* 5: 247-253.

Teile der unter Kapitel 4.2 dargestellten Ergebnisse sind veröffentlicht in

Behrend O, Brand A, Kapfer C, Grothe B (2002) Auditory response properties in the superior paraolivary nucleus of the gerbil. *J Neurophysiol* 87: 2915-2928.

## 2 Einleitung

Die Verarbeitung sensorischer Information ist eine grundlegende Aufgabe des Gehirns. Um diese Aufgabe zu leisten, ist die korrekte Verknüpfung der Neurone von entscheidender Bedeutung. Um, während der Entwicklung des Systems, die erregenden und hemmenden Eingänge in funktionell relevanter Weise räumlich anzuordnen, sind in vielen Fällen erfahrungsabhängige Mechanismen involviert. Ein besonders interessantes Modellsystem zur Untersuchung der spezifischen räumlichen Anordnung von Eingängen ist dabei der im auditorischen Hirnstamm gelegene neuronale Schaltkreis, der eine Mikrosekunden-genaue Zeitverarbeitung im Kontext von Schalllokalisation tiefer Frequenzen im Azimut erlaubt.

### 2.1 Der auditorische Hirnstamm

Das auditorische System der Säugetiere setzt sich aus den peripher gelegenen Strukturen des Außenohrs, Mittelohrs, und Innenohrs und den zentral im Gehirn vorliegenden Strukturen der aufsteigenden Hörbahn zusammen. Die aufsteigende Hörbahn wiederum gliedert sich in mehrere Verarbeitungsebenen, die parallel Stimulusparameter wie Frequenzgehalt, Intensität und Zeitverhalten komplexer akustischer Signale analysieren. Das auditorische Stammhirn stellt dabei die erste zentrale Verarbeitungsebene des auditorischen Systems dar und ist aus den Kerngebieten des Nucleus cochlearis (CN), des oberen Olivenkomplexes (SOC) und des lateralen Lemniskus (LL) aufgebaut. Dabei ist der SOC die erste Station der aufsteigenden Hörbahn, die konvergierende Eingänge von beiden Ohren erhält. Der SOC der Säugetiere erstreckt sich rostral zum Facialisnerven und besteht aus mehreren Kerngebieten, die bilateralsymmetrisch zur Mittellinie des Hirnstamms auf Höhe des CN angeordnet sind (Wüstenrennmaus: Budinger et al. 2000; Nordeen et al. 1983; Hund: Goldberg & Brown 1968, 1969; Katze: Ramon y Cajal 1907; Meerschweinchen: Schofield & Cant 1991, 1992; Mensch: Bazwinsky et al. 2003; Moore 1987; Ratte: Harrison & Feldman 1970; Paxinos & Watson 1986; verschiedene Säugetiere (> 42 Arten): Fuse 1919; Hofmann 1908; s.h. auch die Übersichtsartikel Helfert et al. 1991; Schwartz 1992; Thompson & Schofield 2000). Im allgemeinen wird dabei zwischen drei klar strukturierten Hauptkerngebieten, dem medialen Nucleus des Trapezkörpers (MNTB), der medialen oberen Olive (MSO) und der lateralen oberen Olive (LSO), sowie einer Reihe von weniger deutlich strukturierten periolivären Kerngebieten unterschieden. Zu diesen periolivären Zellgruppen werden der laterale und ventrale Nucleus des Trapezkörpers (LNTB, VNTB), der dorsomediale perioliväre Nucleus

(DMPO) bzw. bei Nagetieren der dem DMPO homologe superiore perioliväre Nucleus (SPN; s.h. die Übersichtsartikel Schwartz 1992, Thompson & Schofield 2000), die anteriore, posteriore und dorsale perioliväre Region (APO, PPO, DPO), der dorsolaterale, ventrolaterale und der ventromediale perioliväre Nucleus (DLPO, VLPO, VMPO) sowie der Nucleus des zentralen akustischen Trakts (NCAT / ALPO) gezählt.

## **2.2 Funktion und Physiologie der medialen oberen Olive**

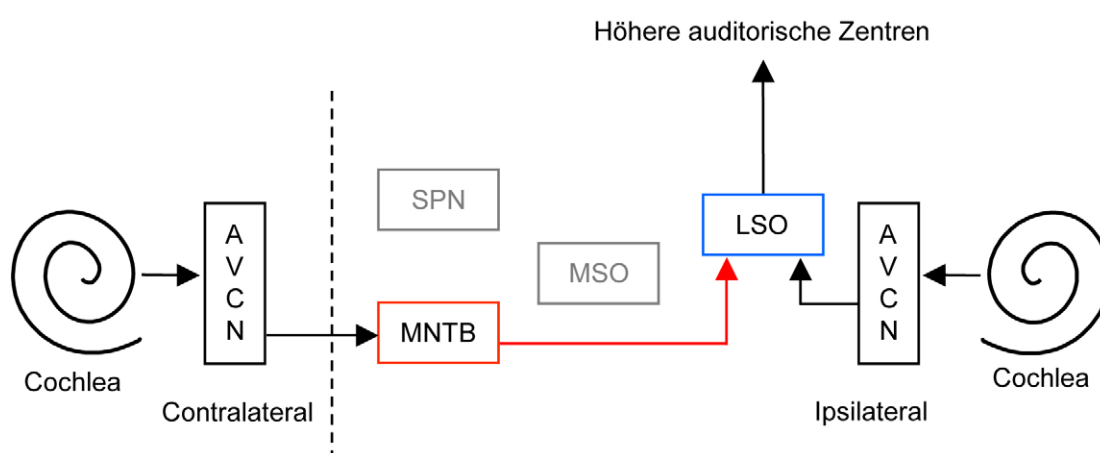
### **2.2.1 Zeitverarbeitung im Kontext von Schalllokalisation im Azimut**

Von den verschiedenen Funktionen die das auditorische System zu leisten hat, liegt eine der grundlegendsten und doch zugleich wichtigsten Aufgaben, neben der Schalldetektion, in der Lokalisation von verhaltensrelevanten Schallquellen in der horizontalen Ebene. Da im Gegensatz beispielsweise zum visuellen und somatosensorischen System die Raumposition eines Stimulus im auditorischen System nicht schon auf der Ebene des Sinnesorgans (hier der Basilarmembran) codiert wird, sind speziell angepasste neuronale Mechanismen notwendig, mit Hilfe derer zentral in der Hörbahn gelegene Strukturen aus der kombinierten Aktivität beider Ohren die Position der Schallquelle berechnen können. Dabei stehen nach der klassischen „Duplex-Theorie der Schalllokalisation“ (Rayleigh 1907; Thompson 1882) zwei binaurale Signalparameter und damit Verarbeitungsmechanismen zur Schalllokalisation im Azimut zur Verfügung. Zum einen ist dies die Analyse von interauralen Intensitätsdifferenzen (IID), zum anderen die Auswertung von interauralen Zeitdifferenzen (ITD) (Rayleigh 1907; Thompson 1882; s.h. auch die Übersichtsartikel Irvine 1986; Yin 2002). Diese Signalparameter stehen allerdings fast nur in der horizontalen Ebene zur Verfügung, in der vertikalen Ebene, also zur Bestimmung der Elevation einer Schallquelle, können diese binauralen Signalparameter daher nicht verwendet werden (Butler 1969; Gardner & Gardner 1973; Hebrank & Wright 1974a; s.h. auch den Übersichtsartikel Wightman & Kistler 1993). Für die Lokalisation in der vertikalen Ebene stehen hauptsächlich spektrale Signalparameter zur Verfügung, welche beispielsweise durch die Charakteristik des Außenohrs und die sich daraus ergebenden sog. HRTFs („head related transfer functions“) erzeugt werden (Gardner & Gardner 1973; Hebrank & Wright 1974b; Middlebrooks et al. 1989; s.h. auch den Übersichtsartikel Wightman & Kistler 1993).

Die Generierung interauraler Intensitätsdifferenzen beruht auf der Tatsache, dass der Kopf eines Tieres als Hindernis für Schallwellen wirkt. Wird eine Schallquelle vor dem



Kopf aus der frontalen in eine weiter laterale Position verschoben, so werden die Schallwellen durch den Kopf reflektiert. Dieser sog. „Kopfschatteneffekt“ führt zu einer Abschwächung der Intensität im Schalldruckpegel am der Schallquelle abgewandten Ohr. Dadurch entsteht zwischen beiden Ohren eine richtungsabhängige Intensitätsdifferenz im Schalldruckpegel, die dynamisch mit zunehmender Lateralisierung der Schallquelle zunimmt. Je weiter eine Schallquelle aus der frontalen Position zu einer Seite des Kopfes verschoben wird, desto größer ist die erzeugte IID. Wie eine Vielzahl elektrophysiologischer Arbeiten gezeigt haben, erfolgt die primäre neuronale Auswertung von IIDs in der lateralen oberen Olive (LSO) und beruht auf einer subtraktiven Interaktion von Erregung und Hemmung (s.h. die Übersichtsartikel Irvine 1986, 1992 und Yin 2002).



**Abbildung 1:** Afferenzen zur lateralen oberen Olive (LSO)

Das Schema zeigt die Verschaltung der afferenten Eingänge zur rechten LSO, die linke LSO ist nicht dargestellt. Die LSO-Neurone erhalten monaural erregende, glutamaterge Eingänge durch eine direkte Projektion von Fasern der SBCs aus dem ipsilateralen AVCN. Daneben erhalten die LSO Neurone monaural hemmende, glycinerge Eingänge durch Zellen des ipsilateralen MNTB. Die MNTB-Neurone erhalten über Calyxsynapsen erregende, glutamaterge Projektionen durch dicke Axone von GBCs aus dem contralateralen AVCN.

Schwarze Pfeile: erregende Projektionen; Rote Pfeile: hemmende Projektionen

gestrichelte Linie: Mittellinie des Hirnstamms

Innerhalb des SOC ist die LSO anatomisch durch ihre charakteristische S – oder V – Form deutlich von allen anderen Kerngebieten zu trennen. Die Zellen der LSO erhalten von der ipsilateralen Cochlea über die sog. „spherical bushy cells“ (SBCs) des ipsilateralen anteroventralen Nucleus Cochlearis (AVCN) erregende, glutamaterge Eingänge, sowie von der contralateralen Cochlea über die Zellen des ipsilateralen MNTB inhibitorische, glycinerge Projektionen (Cant & Casseday 1986; Glendenning et al. 1985, Abb. 1). Die ipsilateral gelegenen glycinergen MNTB-Neurone erhalten dabei von der contralateralen Cochlea über die sog. „globular bushy cells“ (GBCs) des contralateralen AVCN erregende Eingänge (Cant & Casseday 1986, Abb. 1). Durch diese Konfiguration der Eingänge

codieren die LSO-Zellen aus der Interaktion von Erregung und Hemmung die Raumrichtung der Schallquelle (Boudreau & Tsuchitani 1968; Guinan et al. 1972a,b; s.h. auch die Übersichtsartikel Irvine 1986, 1992; Yin 2002).

Dieser Mechanismus der Schalllokalisation ist allerdings nach der Duplex-Theorie nur bei vergleichsweise hochfrequentem Schall möglich, wenn die Wellenlänge des Schalls kleiner ist als der Ohrabstand des Tieres. Nur wenn diese Voraussetzung zutrifft können durch den Kopfschatten für das Tier verwertbare IIDs erzeugt werden (Rayleigh 1907; Thompson 1882). Diese Regel gilt in dieser Stringenz allerdings nur für Schallquellen im sog. Fernfeld, d.h. für Schallquellen, welche beispielsweise bei Menschen einen Abstand von mehr als ca. einem Meter zum Kopf haben (Shinn-Cunningham et al. 2000). Im sog. Nahfeld, also in unmittelbarer Nähe zum Kopf, können jedoch auch durch tiefe Frequenzen, welche die oben genannte Beziehung zwischen Wellenlänge und Ohrabstand nicht erfüllen, verwertbare IIDs erzeugt werden (Shinn-Cunningham et al. 2000).

Die durch die Wellenlänge des Schalls und den Ohrabstand des Tieres definierte Grenze für eine Erzeugung auswertbarer IIDs im Fernfeld, stellt nun aber solche Tiere vor ein Problem, deren Hörsystem gut daran angepasst ist Frequenzen unterhalb dieser Grenze zu hören und für die eine Analyse dieser tieffrequenten Schalle im Fernfeld von großer Verhaltensrelevanz ist (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2000). Da tieffrequenter Schall im Vergleich zu hochfrequentem Schall eine größere räumliche Ausbreitung besitzt, waren vorallem Tiere die über große Distanzen kommunizieren, weil sie beispielsweise über weitläufige Streifgebiete verfügen (z.B. Raubtiere, Huftiere und Primaten) oder weil sie Habitate wie Wüsten oder Erdbauten bewohnen (z.B. die Wüstenrennmaus; Rosowski et al. 1999) darauf angewiesen einen zweiten Mechanismus zu entwickeln, um tieffrequenten Schall in der horizontalen Ebene zu lokalisieren (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2000). Wie psychophysisch beim Menschen von Rayleigh (1907) und Thompson (1882) beschrieben, steht dazu für tieffrequente Reintöne als einziger Parameter der Unterschied in der Ankunftszeit der Schallwellen an den beiden Ohren zur Verfügung. Diese interauralen Zeitdifferenzen (ITDs) sind allerdings für fast alle Säugetiere außerordentlich klein, sie liegen nur in einer Größenordnung von ca. 40  $\mu$ s bis zu mehreren 100  $\mu$ s (Heffner & Heffner 1980, s.h. auch den Übersichtsartikel Grothe 2000). Die Größe der maximal wahrnehmbaren ITD (verhaltensrelevanter Bereich) ist dabei vom Abstand der beiden Ohren (und damit von der Kopfgröße) abhängig. So lassen sich beim Menschen durch Lateralisation einer Schallquelle um 90° aus der frontalen Position maximal ITDs von ca. 700  $\mu$ s (s.h. den Übersichtsartikel Wightman & Kistler 1993) erzeugen, bei Tieren

mit kleinerem Ohrabstand sind die maximal wahrnehmbaren ITDs entsprechend kleiner z.B. bei Carnivoren im Bereich zwischen 76 – 440  $\mu$ s (Calford et al. 1986; Heffner & Heffner 1987; Yin & Chan 1990) und bei den meisten Nagetieren im Bereich zwischen 50 – 160  $\mu$ s (Heffner & Heffner 1980, 1987; s.h. auch den Übersichtsartikel Heffner & Heffner 1992). Trotz dieser extrem kleinen Laufzeitunterschiede zwischen beiden Ohren sind Säugetiere, deren Hörsystem sich auf die Verarbeitung tieffrequenter Schalle spezialisiert hat, in der Lage ITDs zur Schalllokalisation zu nutzen. In Verhaltensexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass diese tieffrequent hörenden Säugetiere ITDs im Bereich von wenigen dutzenden  $\mu$ s auflösen können (Mensch: 7 – 30  $\mu$ s; Klumpp 1953; Klumpp & Eady 1956; Katze: 25 $\mu$ s; Wüstenrennmaus: 36  $\mu$ s; Heffner & Heffner 1987, 1988; s.h. auch den Übersichtsartikel Blauert 1997: Tab. 2.3, Seite 153).

Die psychophysisch beobachtete, extrem kurze Zeitauflösung bei der Auswertung von ITDs setzt voraus, dass der neuronale Mechanismus, welcher diese Aufgabe zu leisten hat, über eine ebenso extrem schnelle Kinetik verfügt. Um eine präzise Analyse von Zeitdifferenzen im  $\mu$ s-Bereich zu gewährleisten, benötigt dieser Mechanismus eine Kinetik, die weit über dem liegt, was andere Sinnessysteme zu leisten haben. Nach herrschender Meinung ist der Mechanismus der initialen Verarbeitung von ITDs in der medialen oberen Olive (MSO) zu finden (Brand et al. 2002; Caird & Klinke 1983; Cant & Casseday 1986; Clark & Dunlop 1968; Goldberg & Brown 1968, 1969; Guinan et al. 1972a,b; Harrison & Feldman 1970; Harrison & Irving 1966b; Langford 1984; Lindsey 1975; Masterton & Diamond 1967; Masterton et al. 1975; Perkins 1973; Spitzer & Semple 1995; Watanabe et al. 1968; Yin & Chan 1990). Sowohl in ihrer Anatomie wie auch in ihrer Physiologie zeigen MSO-Neurone in tieffrequent hörenden, ITD-nutzenden Tieren Spezialisierungen, welche die erforderliche schnelle Kinetik ermöglichen.

### **2.2.2 Afferenzen und Efferenzen der medialen oberen Olive**

Innerhalb des SOC's ist die MSO als ovales Kerngebiet strukturell deutlich abgrenzbar und liegt in ihrem caudalen Beginn ventro – medial zur LSO und lateral zum MNTB. Der für die MSO charakteristische Hauptzelltyp („principle cell“, PC) sind spindelförmige Zellen deren meist bipolare Dendriten an den gegenüberliegenden Polen der Zellen entspringen (Harrison & Feldman 1970; Ramon y Cajal 1907; Stotler 1953; s.h. auch den Übersichtsartikel Schwartz 1992). Neben diesem Hauptzelltyp lassen sich in der MSO noch bis zu drei weitere, weit weniger häufig vorkommende Zelltypen unterscheiden. Dies

sind die sog. multipolaren, marginalen und rostro – caudal elongierten Neurone (Kiss & Majorossy 1983; s.h. auch die Übersichtsartikel Schwartz 1992 und Thompson & Schofield 2000). Da diese Zelltypen im Gegensatz zu den spindelförmigen Zellen einerseits in relativ geringer Zahl vorkommen und da andererseits die Funktion der MSO in der ITD-Verarbeitung den fusiformen Zellen zugeschrieben wird (Smith 1995), wird im weiteren Verlauf der Arbeit nicht weiter auf diese Zelltypen eingegangen.

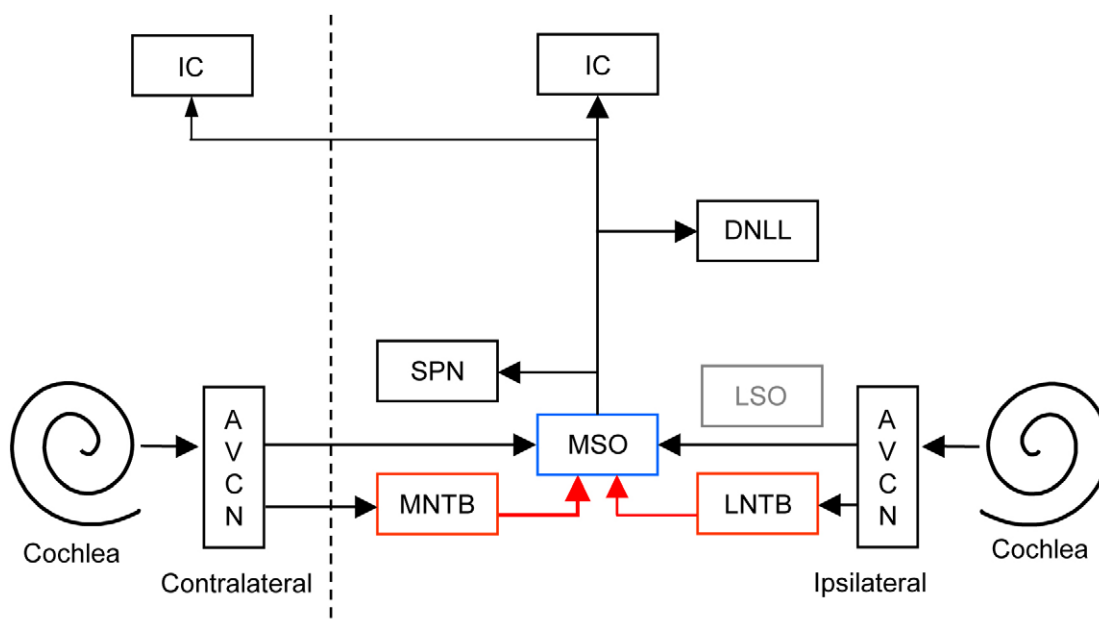
In Säugetieren mit spezialisiertem tieffrequentem Hören zeichnet sich die MSO durch eine Reihe von anatomischen Besonderheiten aus. Am auffälligsten davon ist die charakteristische Anordnung der spindelförmigen MSO-Neurone im Nucleus. Die Zellkörper der Neurone sind dabei in einem eng definierten, dorso – ventral ausgerichteten Zellband in etwa mittig im Nucleus schichtartig übereinander gestapelt und sowohl medial wie lateral von nahezu zellfreiem Neuropil umgeben. Die bipolaren, wenig verzweigten Dendriten der Neurone erstrecken sich orthogonal zu diesem Zellband nach medial und lateral in das Neuropil (Irving & Harrison 1967; Moore & Moore 1971; Nordeen et al. 1983; Perkins 1973; Ramon y Cajal 1907; Strominger & Hurwitz 1976). Da das zellfreie Neuropil mit der Lage der Dendriten zusammenfällt wird es im folgenden als Dendritenraum bezeichnet. In Säugetieren, die sich nicht auf die Analyse tiefer Frequenzen spezialisiert haben, wie z.B. Ratte, Maus, Opossum oder in reinen Spezialisten für hochfrequentes Hören wie Fledermäusen findet sich zwar ebenfalls eine MSO (Ratte: Harrison & Feldman 1970; Rogowski & Feng 1981; Maus: Franklin & Paxinos 1997; Ollo & Schwartz 1979; Opossum: Willard & Martin 1983, 1984; Fledermäuse: Casseday et al. 1988; Grothe et al. 1994; Schweizer 1981; Zook & Casseday 1982a,b), jedoch ist die hochgeordnete Anordnung der MSO-Zellen im Nucleus nicht oder nur sehr eingeschränkt (Ratte: Harrison & Feldman 1970; Rogowski & Feng 1981) vorhanden.

Die Zellen der MSO erhalten binaural erregende, glutamaterge Eingänge von den SBCs des ipsilateralen und contralateralen AVCN, die zum Großteil räumlich getrennt auf die bipolaren Dendriten der MSO-Neurone projizieren (Cant & Hyson 1992; Harrison & Irving 1966a,b; Perkins 1973; Ramon y Cajal 1907; Russell & Moore 1995; Smith et al. 1993; Stotler 1953; Warr 1966; Abb. 2). Die lateralen Dendriten werden dabei von Collateralen der Axone ipsilateraler SBCs, die medialen Dendriten von Collateralen der Axone contralateraler SBCs innerviert. Sowohl die ipsilaterale als auch die contralaterale AVCN-Projektion innerviert zu einem geringen Ausmaß auch die Somata der MSO-Neurone (Clark 1969a,b; Kiss & Majorossy 1983; Lindsey 1975; Osen 1969; Perkins 1973; Ramon y Cajal 1907; Smith et al. 1993; Stotler 1953; s.h. auch den Übersichtsartikel Thompson & Schofield 2000).

Die SBCs ihrerseits erhalten direkte erregende Eingänge von Zellen des Spiralganglions über die Fasern des auditorischen (VIII) Nervens (Brown et al. 1988; Rouiller et al. 1986; Spoendlin 1971). In ihrer Physiologie spiegeln die SBCs dabei die Eigenschaften der auditorischen Nervenfasern wieder (Joris et al. 1998). So zeigen sie bei einer Stimulation mit tieffrequenten Reintönen (bis ca. 2 kHz in Säugetieren) ebenfalls ein sog. phasengekoppeltes Antwortverhalten (Joris et al. 1994a,b), d.h. die Zelle antwortet mit hoher Präzision immer nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der sinusförmigen Schallwelle, also an einer bestimmten Phasenlage der Schwingung (Galambos & Davis 1943; Rose et al. 1967). Durch das phasengekoppelte Antwortverhalten bleibt die Zeitstruktur des Schallsignals, welches durch die Zellen des Spiralganglions und den VIII-Nerven von der Cochlea übertragen wird, im Aktionspotentialmuster der SBCs erhalten und kann an die MSO-Zelle weitergegeben werden (Joris et al. 1994a,b; s.h. auch den Übersichtsartikel Yin 2002).

Zusätzlich zu diesen binaural erregenden Eingängen erhalten die MSO-Zellen markante inhibitorische Eingänge von beiden Ohren (Abb. 2). Diese inhibitorischen Projektionen stammen von glycinergen Zellen aus dem ipsilateralen MNTB und dem ipsilateralen LNTB (Adams & Mugnaini 1990; Cant & Hyson 1992; Glendenning & Baker 1988; Grothe & Sanes 1993, 1994; Kuwabara & Zook 1991, 1992; Smith 1995; Wenthold et al. 1987). Die glycinergen MNTB-Zellen selbst erhalten phasengekoppelte, erregende Eingänge von GBCs aus dem contralateralen AVCN (Harrison & Irving 1966a,b; Kuwabara et al. 1991; Morest 1968a,b; Smith & Rhode 1987; Smith et al. 1991; Tolbert et al. 1982; Warr 1972; s.h. auch den Übersichtsartikel Thompson & Schofield 2000). Im Gegensatz zu SBC-Axonon besitzen die Axone der GBCs einen ungewöhnlich großen Durchmesser (4 – 12  $\mu\text{m}$ ; Harrison & Warr 1962; Morest 1968b; Tolbert et al. 1982; s.h. auch den Übersichtsartikel von Gersdorff & Borst 2002), was zusammen mit der starken Myelinisierung der Axone eine sehr hohe Geschwindigkeit in der Signalübertragung ermöglicht. In adulten Tieren innerviert je eine Collaterale eines solchen GBC-Axons eine MNTB-Zelle (Friauf & Ostwald 1988; Kuwabara et al. 1991; Morest 1968b) mit einem sog. Calyx von Held, der wohl größten Synapse des Gehirns (Held 1893; Ramon y Cajal 1907). Die Calyxsynapse zeichnet sich neben ihrer Größe aber vor allem durch besondere strukturelle (Rowland et al. 2000; Taschenberger et al. 2002) und physiologische Eigenschaften aus (s.h. den Übersichtsartikel von Gersdorff & Borst 2002), die sie zur wahrscheinlich zeitlich genauesten Synapse des Gehirns machen. So zeigen sie eine äußerst niedrige zeitliche Variabilität in der Signalübertragung (Guinan & Li 1990; Taschenberger &

von Gersdorff 2000) gepaart mit extrem kurzen synaptischen Verzögerungen (im Bereich von 200  $\mu$ s; Taschenberger & von Gersdorff 2000). Durch ihre axonalen Eigenschaften sowie mittels der Signalübertragung über die Calyxsynapse, kann die phasengekoppelte Erregung der GBCs daher besonders schnell und mit hoher Zuverlässigkeit an die MNTB-Zelle weitergegeben werden.



**Abbildung 2:** Afferenzen und Efferenzen zur medialen oberen Olive (MSO)

Das Schema zeigt die Verschaltung der afferenten und efferenten Eingänge zur rechten MSO, die linke MSO ist nicht dargestellt. Die MSO-Neurone erhalten binaural erregende, glutamaterge Eingänge durch direkte Projektionen von Fasern der SBCs aus dem ipsilateralen und contralateralen AVCN. Dabei ist die ipsilaterale SBC-Projektion räumlich auf die lateralen Dendriten und die contralaterale Projektion räumlich auf die medialen Dendriten der bipolaren MSO-Neurone beschränkt. Zusätzlich erhält die MSO binaural hemmende, glycinerge Eingänge durch Zellen des ipsilateralen MNTB und LNTB. Die MNTB-Neurone erhalten über Calyxsynapsen (Calyx von Held) erregende, glutamaterge Projektionen durch dicke Axone von GBCs aus dem contralateralen AVCN. Die Neurone des LNTB erhalten über calyxähnliche Synapsen (Endkopfsynapsen von Held) ebenfalls erregende, glutamaterge Eingänge durch die Fasern von GBCs aus dem ipsilateralen AVCN. Die inhibitorische Projektion vom MNTB zur MSO (dicker roter Pfeil) ist sowohl anatomisch wie physiologisch deutlich stärker als die inhibitorische Projektion des LNTB (dünner roter Pfeil).

Die erregenden, glutamatergen Efferenzen der MSO projizieren vorallem zum ipsilateralen DNLL und IC. Die in verschiedenen Tiergruppen zu beobachtende Projektion zum contralateralen IC ist im allgemeinen schwächer (dünner schwarzer Pfeil) als die ipsilaterale Projektion. Innerhalb des SOC projizieren die Axone der MSO-Neurone zum SPN.

Schwarze Pfeile: erregende Projektionen; Rote Pfeile: hemmende Projektionen  
gestrichelte Linie: Mittellinie des Hirnstamms

In ihrer Physiologie zeigen die MNTB-Zellen daher eine ebenso präzise Phasenkopplung an tieffrequente Reintöne wie sie in GBCs festgestellt werden konnte (bis ca. 1,5 kHz; Paolini et al. 2001; Smith et al. 1998). Damit wird im Antwortverhalten der MNTB-Zellen die Zeitstruktur des Schallsignals erhalten und von einer Erregung in einen zeitlich

präzisen inhibitorischen Eingang zu MSO-Neuronen umgewandelt (s.h. die Übersichtsartikel Grothe 2000; Grothe 2003).

Die glycinergen LNTB-Zellen erhalten erregende Eingänge von GBCs aus dem ipsilateralen AVCN über einige wenige calyxähnliche Synapsen, die sog. Endkopfsynapsen von Held (Adams 1983, Cant & Hyson 1992; Spirou & Berrebi 1996, 1997; Warr 1966; s.h. auch den Übersichtsartikel Cant 1991). Durch die anatomisch gleichen Eingänge wie MNTB-Zellen und die Signalübertragung durch calyxähnliche Strukturen sollten auch die LNTB-Zellen in der Lage sein die Zeitstruktur des Schallsignals genau weiterzugeben. Stärkeren Einfluss auf die inhibitorischen Projektionen übt jedoch das contralaterale Ohr aus, da die MNTB-Projektion zur MSO anatomisch wie physiologisch stärker ist als die ipsilaterale Projektion über den LNTB (Cant & Hyson 1992; Grothe & Sanes 1993; Kuwabara & Zook 1992).

Die Efferenzen der MSO-Zellen sind rein exzitatorische (Helfert et al. 1989; Oliver et al. 1995) Projektionen zu Kerngebieten des SOC, des LLs und des Mittelhirns. In Abb. 2 sind nur die wichtigsten Efferenzen von MSO-Zellen gezeigt. Innerhalb des SOC ziehen Collaterale der MSO-Axone zum SPN / DMPO (Kuwabara & Zook 1999; Morest 1968a). Hauptsächlich ziehen die Axone der MSO-Neurone aber zum ipsilateralen dorsalen Nucleus des lateralen Lemniskus (DNLL) und zum ipsilateralen Colliculus inferior (IC). Collaterale dieser Axone ziehen auch in den contralateralen IC, wobei die Stärke der efferenten Projektion zum contralateralen IC kann je nach Tiergruppe variieren kann, im allgemeinen scheint sie deutlich schwächer zu sein als die Projektion zum ipsilateralen IC (zu den MSO-Efferenzen s.h. die Übersichtsartikel Helfert & Aschoff 1997; Schwartz 1992; Thompson & Schofield 2000).

### 2.2.3 Mechanismen der ITD-Verarbeitung in der MSO

Eine Reihe von elektrophysiologischen Studien *in vivo* konnten zeigen, dass MSO-Neurone tieffrequent hörender Säugetiere (Frequenzbereich unter 2 kHz) in der Lage sind ITDs im Bereich dutzender Mikrosekunden aufzulösen (Chinchilla: Langford 1984; Hund: Goldberg & Brown 1969; Katze: Caird & Klinke 1983; Guinan et al. 1972a,b; Moushegian et al. 1964; Yin & Chan 1990; Känguruhmaus: Crow et al. 1978; Moushegian et al. 1975; Kaninchen: Batra et al. 1997a,b; Wüstenrennmaus: Brand et al. 2002; Spitzer & Semple 1995). In Übereinstimmung mit ihrer Funktion in der Schalllokalisation zeigt die Tonotopie der MSO in einigen der untersuchten Tierarten eine, im Vergleich zu hohen Frequenzen, erkennbare Überrepräsentation tiefer Frequenzen (Hund: Goldberg & Brown 1969; Katze: Guinan et al. 1972b; Galambos et al. 1959;

Warr 1966; Wüstenrennmaus: Brand 2003). Wie aus den oben genannten Studien hervorgeht, zeigen die MSO-Zellen, wie ihre Eingänge, bei Stimulation mit tieffrequenten Reintönen ein phasengekoppeltes Antwortverhalten. Bei einer binauralen Stimulation mit sinoidalen, in ihrer Phase (und damit auch zeitlich) variabel verschobenen Reintönen, antworten die MSO-Neurone mit einer charakteristischen zyklischen, nahezu sinusförmigen, ITD-Funktion. Die ITD-Funktion einer MSO-Zelle zeigt dabei unabhängig von der Frequenz des Stimulus ein stationäres Maximum in ihrer Antwort (sog. „beste ITD“).

### 2.2.3.1 Ortscode der ITD-Verarbeitung durch Kreuzkorrelation

Klassischerweise, vorallem basierend auf der Interpretation von Daten aus der MSO des Hundes und der Katze, wurde der grundlegende neuronale Mechanismus der ITD-Verarbeitung in der MSO durch einen Kreuzkorrelationsmechanismus beschrieben, welcher auf der Basis eines von Jeffress (1948) vorgeschlagenen Modells entwickelt wurde (s.h. den Übersichtsartikel Yin 2002). Nach dieser Theorie agieren die MSO-Neurone als Koinzidenzdetektoren, die an Hand der Ankunftszeit ausschließlich erregender Eingänge von beiden Ohren die Lage einer Schallquelle im Raum codieren können (Goldberg & Brown 1969; Jeffress 1948). Eine Koinzidenzdetektorzelle, wie sie das Modell vorschlägt, sollte nur dann maximal antworten (ihre „beste ITD“ zeigen), wenn phasengekoppelte, binaural erregende Eingänge absolut zeitgleich an der Zelle eintreffen. Um eine Koinzidenz in den erregenden Eingängen zur MSO-Zelle für jede ITD im verhaltensrelevanten Bereich des Tieres zu erreichen, sollten nach dem Jeffressmodell die Laufzeitunterschiede der Schallwellen zwischen beiden Ohren durch axonale Laufzeitdifferenzen im Gehirn kompensiert werden. Die nötigen axonalen Laufzeitdifferenzen sollten dabei durch unterschiedlich lange SBC-Axone von beiden Seiten erzeugt werden. Eine festverdrahtete Anordnung der erregenden Eingänge würde nach Jeffress zu einer Koinzidenzdetektormatrix führen, bei der jede einzelne Zelle mit einer bestimmten, für sie typischen „besten ITD“, eine Position im Azimut codiert, was wiederum zu einer topographischen Repräsentation des Azimuts in der Matrix führen würde (sog. Ortscode der Stimulusposition im Azimut).

Ein solcher Kreuzkorrelationsmechanismus mit einer topographischen Karte des Azimuts konnte allerdings bis jetzt nur bei Vögeln im Nucleus Laminaris (analog zur MSO bei Säugetieren) nachgewiesen werden (Carr & Konishi 1990; Joseph & Hyson 1993; Overholt et al. 1992). Besonders eindrucksvoll ist dieses Prinzip in der Schleiereule realisiert (Carr & Konishi 1988, 1990; Konishi 1973; Saberi et al. 1999). Auch wenn eine

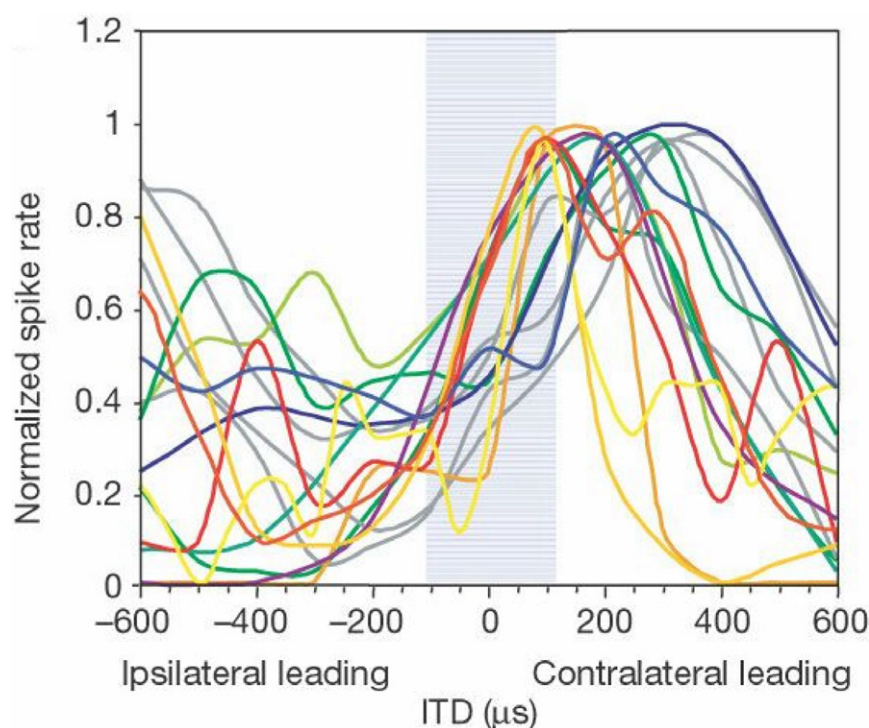


Anzahl von Studien an tieffrequent hörenden und ITDs nutzenden Säugetieren über die letzten 30 Jahre ihre Ergebnisse im Lichte des Jeffressmodells interpretierten, so sind die Evidenzen, dass dieses Modell auch auf Säugetiere tatsächlich zutrifft doch insgesamt nicht überzeugend. Zwar kann die zyklische Struktur der ITD-Funktion und die Stabilität der „besten ITD“ mit einem Koinzidenzdetektormechanismus erklärt werden, die Hinweise auf axonale Verzögerungsketten (Beckius et al. 1999; Smith et al. 1993) und eine topographische Raumkarte in der MSO sind jedoch zweifelhaft. Wie Yin & Chan (1990) in ihrer Untersuchung der Katzen-MSO vorschlagen, müsste diese Raumkarte entlang der rostro – caudalen Achse, senkrecht zur dorso – ventralen Frequenzachse der MSO angelegt sein. Dem widerspricht eine jüngst erschienene Arbeit, die anatomisch die Projektionsmuster physiologisch charakterisierter MSO-Neurone in der Katze untersucht. Danach findet sich weder in der MSO noch im IC eine solche topographische Repräsentation der „besten ITD“ (Oliver et al. 2003). Weiterhin werden, trotz der eindeutigen anatomischen und physiologischen Hinweise auf massive, zeitlich präzise inhibitorische Eingänge zu MSO-Neuronen (s.h. Kapitel 2.2.2) diese vom Jeffress-Modell nicht berücksichtigt (s.h. die Übersichtsartikel Grothe 2000, 2003; McAlpine & Grothe 2003). Es erscheint daher fragwürdig, ob sowohl die Abstimmung einzelner MSO-Zellen als Koinzidenzdetektoren ausschließlich erregender Eingänge, als auch die neuronale Repräsentation von ITDs in Form einer topografischen Raumkarte eine zutreffende Beschreibung der ITD-Verarbeitung bei Säugetieren darstellen.

#### 2.2.3.2 Populationscode der ITD-Verarbeitung in Säugetieren durch zeitlich präzise Inhibition

Eine elektrophysiologische und neuropharmakologische *in vivo* Studie in der MSO der Wüstenrennmaus (Brand et al. 2002) hat dagegen jüngst einen alternativen und überzeugenden Mechanismus der Abstimmung einzelner MSO-Zellen bei der ITD-Verarbeitung aufgezeigt, welcher auch die Interpretation der neuronalen Repräsentation von ITDs in Säugetieren auf eine neue Grundlage stellt (s.h. die Übersichtsartikel Grothe 2003; McAlpine & Grothe 2003). Wie das erste Hauptergebnis der Untersuchung von Brand et al. (2002) zeigt, liegt die maximale Antwort der ITD-Funktionen, also die „beste ITD“ der Neurone für fast alle der untersuchten tieffrequenten Neurone (unter 1,5 kHz) außerhalb des verhaltensrelevanten Bereichs von ITDs, den das Tier aufgrund seiner Kopfgröße maximal erzeugen kann (in der Wüstenrennmaus ca. 120  $\mu$ s, blau unterlegter Bereich Abb. 3). Die Lage der „besten ITD“ hängt dabei von der Bestfrequenz des Neurons ab und verschiebt sich, je tiefer die Frequenz ist, aufgrund der längeren

Zykluslänge zu größeren ITDs und entfernt sich damit immer weiter vom verhaltensrelevanten Bereich (Brand et al. 2002). Werden die ITD-Funktionen auf die jeweilige Bestfrequenz des Neurons normalisiert und als interaurale Phasendifferenz (IPD) dargestellt, so antworten alle Neurone maximal auf eine IPD von ca.  $45^\circ$  (Brand et al. 2002). Ein Wert, wie er auch für eine große Population von ITD-sensitiven Zellen im IC des Meerschweinchens gezeigt werden konnte (McAlpine et al. 2001).



**Abbildung 3:** ITD-Sensitivität in der MSO der Wüstenrennmaus

Dargestellt sind ITD-Funktionen mehrerer MSO-Neurone der Wüstenrennmaus (farbige Kurven), die an der jeweiligen Bestfrequenz des Neurons 20 dB über der Schwelle mit sinusförmigen Reintönen gemessen wurden. Der maximale Anstieg der ITD-Funktionen liegt im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs der den Wüstenrennmäusen auf Grund ihrer Kopfgröße zur Verfügung steht (ca. 120  $\mu$ s; blau unterlegter Bereich). Die maximale Antwort („beste ITD“) liegt für nahezu alle Zellen außerhalb dieses physiologischen Bereichs von ITDs. Die Abbildung wurde aus Brand et al. (2002), Abb. 2, Seite 544 entnommen.

Diese Ergebnisse haben nun mehrere Konsequenzen: erstens sind die meisten Werte der „besten ITD“ für das Tier nutzlos um die Position einer Schallquelle zu bestimmen, da diese Werte außerhalb des Bereichs liegen den es wahrnehmen kann, zweitens steht durch das Zusammenfallen der besten IPDs bei ca.  $45^\circ$  in Säugetieren pro Frequenzkanal nur ein sehr begrenzter Bereich von „besten ITDs“ zur Verfügung, womit der Aufbau einer Koinzidenzdetektormatrix nach Jeffress prinzipiell nur schwer zu realisieren ist (Brand et al. 2002; s.h. auch die Übersichtsartikel Grothe 2003; McAlpine & Grothe 2003). Aus der Anordnung der ITD-Kurven ergibt sich als weitere und entscheidende

Konsequenz, dass die maximale Steigung der Funktionen nahe einer ITD von Null, leicht verschoben ins contralaterale Halbfeld zu liegen kommt (Brand et al. 2002; Abb. 3). Damit ist die maximale Steigung der einzige Parameter der ITD-Funktion der zuverlässig im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs plazierte ist und damit vom Tier genutzt werden kann (Brand et al. 2002; Abb. 3). Neben dieser Tatsache ist der maximale Anstieg der Kurven der Bereich mit der höchsten Dynamik und Sensitivität in der ITD-Funktion, d.h. eine kleine Änderung im Raumwinkel führt zu einer relativ großen Änderung in der Feuerrate der Zelle (Skottun 1998; Skottun et al. 2001). Da dieser Abschnitt der ITD-Funktion eine vergleichsweise niedrige Varianz relativ zur mittleren Feuerrate aufweist und damit die bestmögliche zeitliche Auflösung bietet (s.h. den Übersichtsartikel McAlpine & Grothe 2003), scheint es sinnvoll den maximalen Anstieg der ITD-Funktion im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs zu plazieren um mit möglichst hoher zeitlicher Genauigkeit die Position einer tieffrequenten Schallquelle zu bestimmen. Wie Grothe (2003) und McAlpine & Grothe (2003) aus diesen Ergebnissen ableiten, könnten Säugetiere tieffrequenten Schall mit Hilfe eines Populationscodes lokalisieren. Da die ITD-Funktionen und damit auch die maximalen Steigungen in beiden MSO-Nuclei spiegelbildlich zueinander angeordnet sind, könnte nach diesem Modell die Position einer Schallquelle in höheren Ebenen der aufsteigenden Hörbahn aus der relativen Aktivität mehrerer, innerhalb eines Frequenzkanals gelegener Zellen der linken und rechten MSO bestimmt werden (sog. „push – pull“ Mechanismus; McAlpine et al. 2001; s.h. auch die Übersichtsartikel Grothe 2003; McAlpine & Grothe 2003).

Von grundlegender Bedeutung ist nun der neuronale Mechanismus, der die ITD-Funktionen so abstimmt, dass die maximale Steigung der Kurven im verhaltensrelevanten Bereich, nahe einer ITD von Null, zu liegen kommt. Wie aus dem zweiten Hauptergebnis der Studie von Brand et al. (2002) hervorgeht, kommt dabei einer zeitlich genau abgestimmten Inhibition die entscheidende Rolle zu.

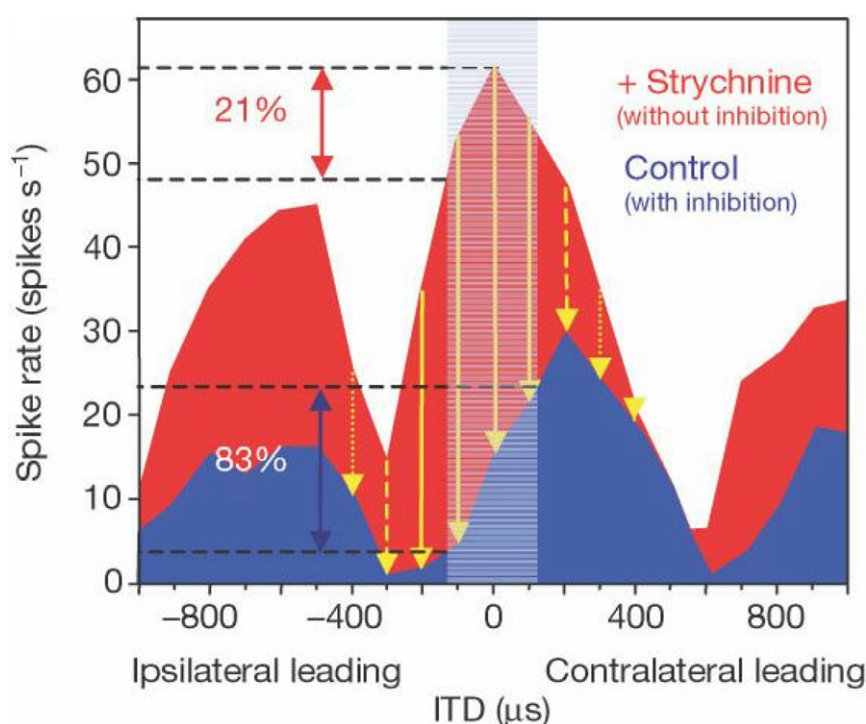
### 2.2.3.3 Rolle der Inhibition bei der Verarbeitung von ITDs in der MSO der Wüstenrennmaus

Da das Jeffress-Modell inhibitorische Eingänge nicht berücksichtigt war, trotz der eindeutigen anatomischen Hinweise, lange umstritten welche Rolle die Inhibition bei der ITD-Verarbeitung in der MSO spielt, oder ob sie überhaupt eine Rolle spielt. Erste physiologische Hinweise auf eine Rolle der Inhibition bei der Zeitverarbeitung in der MSO kamen von *in vitro* Ableitungen mit scharfen Elektroden an Hirnschnitten bei Wüstenrennmäusen (Grothe & Sanes 1993, 1994). Diese Arbeiten erbrachten den ersten

physiologischen Nachweis, dass evozierte glycinerge Inhibition das Antwortverhalten von MSO-Neuronen in einem an tieffrequentes Hören angepassten Tier erheblich verändern kann (Grothe & Sanes 1993). Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die zeitliche Abstimmung der Inhibition wichtig ist um ein genaues Zeitfenster für die Koinzidenzdetektion der erregenden Eingänge zu setzen, dabei ergaben sich auch erste, indirekte Hinweise auf eine schnelle Kinetik der Inhibition (Grothe & Sanes 1994). Klarheit über die Funktion der glycinergen Inhibition in der ITD-Verarbeitung brachten erst die bereits in Kapitel 2.2.3.2 erwähnten extrazellulären *in vivo* Ableitungen von Brand et al. (2002) in der MSO der Wüstenrennmaus. Durch eine iontophoretische Applikation von Strychnin (spezifischer Antagonist für Glycinrezeptoren; Young & Snyder 1973) während der Ableitungen konnten sie das Verhalten einzelner MSO-Neurone bei der ITD-Verarbeitung unter Kontrollbedingungen und unter selektiver pharmakologischer Blockade der glycinergen Inhibition analysieren. Dabei gelang erstmals der physiologische Nachweis eines grundlegenden Einflusses glycinerger Inhibition auf das Antwortverhalten einzelner MSO-Neurone bei der Verarbeitung von ITDs in einem auf tieffrequentes Hören spezialisierten Tier. Unter Kontrollbedingungen (mit stimulusevozierter Inhibition) zeigten die MSO-Neurone dabei die in Kapitel 2.2.3.2 beschriebene ITD-Sensitivität mit der maximalen Steigung der Funktion nahe einer ITD von Null innerhalb des verhaltenrelevanten Bereichs von ITDs, und die „beste ITD“ außerhalb dieses physiologischen Bereichs (blaue Funktion, Abb. 4; Brand et al. 2002). Wurde die Inhibition jedoch durch die Applikation von Strychnin pharmakologisch blockiert, zeigten sich zwei miteinander in Beziehung stehende Effekte. Erstens erhöhte sich die Feuerrate der Zellen in einer ITD-spezifischen Art und Weise, wobei für einige ITDs starke Erhöhungen und für andere ITDs nur mäßige Erhöhungen in der Feuerrate zu erkennen waren (rote Kurve, Abb.4; Brand et al. 2002). Zweitens verschob sich dadurch die „beste ITD“ aller untersuchter Zellen von außerhalb ins Zentrum des verhaltensrelevanten Bereichs nahe zu einer ITD von Null, was wiederum die maximale Steigung der Funktionen größtenteils außerhalb des verhaltensrelevanten Bereichs platzierte (Brand et al. 2002). Dadurch reduzierte sich der zur ITD-Auswertung nutzbare dynamische Bereich der Funktionen deutlich (rote Kurve, Abb. 4; Brand et al. 2002). Wie aus diesen Ergebnissen hervorgeht, wird durch eine Koinzidenzdetektion der erregenden Eingänge eine basale ITD-Sensitivität geschaffen, welche wahrscheinlich auf ungefähr gleichen axonalen Verzögerungszeiten von beiden Seiten basiert (Brand et al. 2002; s.h. auch die Übersichtsartikel Grothe 2003; McAlpine & Grothe 2003).

Die Rolle der glycinergen Inhibition liegt nun darin, diese basale ITD-Sensitivität so

zu justieren, dass die maximale Steigung der ITD-Funktion bestmöglich im verhaltensrelevanten Bereich zu liegen kommt (Brand et al. 2002). Um dies zu leisten ist allerdings eine präzise zeitliche Koordinierung der Inhibition in Relation zur Erregung nötig, d.h. sie muss in einer spezifischen Phasenrelation zur Erregung an der Zelle eintreffen (Brand et al. 2002). Folglich muss die Inhibition die Zeitstruktur des Signals genau wiedergeben können und daher über eine schnelle Kinetik verfügen. Da die Inhibition selbst nicht ITD-sensitiv ist, kann dies nur durch phasengekoppelte glycinerge Eingänge erreicht werden (Brand et al. 2002; s.h. auch die Übersichtsartikel Grothe 2003; McAlpine & Grothe 2003).



**Abbildung 4:** Rolle der Inhibition bei der ITD-Verarbeitung in der MSO

Dargestellt ist die ITD-Funktion einer MSO-Zelle der Wüstenrennmaus (Bestfrequenz 1060 Hz) unter Kontrollbedingungen (blaue Funktion) und unter pharmakologischer Blockade der glycinergen Inhibition durch iontophoretische Applikation von Strychnin während der Ableitung (rote Funktion). Unter Kontrollbedingungen liegen 83% des dynamischen Bereichs (maximaler Anstieg) der ITD-Funktion innerhalb des verhaltensrelevanten Bereichs von ITDs (blau unterlegter Bereich), die „beste ITD“ liegt außerhalb dieses Bereichs im contralateralen Halbfeld. Durch die Blockade der glycinergen Inhibition erhöht sich die Feuerrate der Zelle zu bestimmten ITDs stark, während sie sich zu anderen ITDs kaum verändert. Dabei verschiebt sich die „beste ITD“ in den verhaltensrelevanten Bereich und liegt bei einer ITD von Null. Folglich reduziert sich der im verhaltensrelevanten Bereich gelegene dynamische Bereich der Funktion auf 21%. Die gelben Pfeile weisen auf einen unterschiedlich starken Einfluss der Inhibition zu verschiedenen ITDs hin. Die Abbildung wurde aus Brand et al. (2002), Abb. 3, Seite 545 entnommen.

Ein, auf der Basis dieser Ergebnisse modifiziertes neuronales Modell der MSO (Brughera et al. 1996; Carney 1993) kann zeigen, dass eine contralateral führende,

phasengekoppelte Inhibition (durch den MNTB) in der Lage ist, die beobachtete Justierung der ITD-Funktion zu erklären (Brand et al. 2002). Dabei resultiert die Interaktion der koinzident ausgelösten exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs) und des in Relation dazu früher ausgelösten inhibitorischen postsynaptischen Potentials (IPSP) der contralateralen Seite in einer Reduzierung der Feuerrate der Zelle und in einer Verschiebung der „besten ITD“ in das contralaterale Halbfeld. Damit einhergehend verschiebt sich der maximale Anstieg der ITD-Funktion in den physiologischen Bereich (Brand et al. 2002). Das Ausmaß der Verschiebung des maximalen Anstiegs ist nach diesem Modell von der synaptischen Leitfähigkeit der hyperpolarisierenden Ströme abhängig. Allerdings fordert das Modell eine außerordentlich schnelle Inhibition mit Zeitkonstanten der synaptischen Ströme im Bereich von wenigen hundertens von  $\mu$ s, Werte wie sie bis jetzt für inhibitorische postsynaptische Ströme und Potentiale in noch keinem System beschrieben wurden. Wie bereits in Kapitel 2.2.2 dargestellt, unterstützen die anatomischen und physiologischen Eigenschaften der GBC – MNTB – MSO – Projektion die Hypothese einer contralateralen, schnellen und phasengekoppelten Inhibition. Es bleibt jedoch unklar wie die zweifelsohne hohe zeitliche Präzision der präsynaptischen Eingänge postsynaptisch in der MSO-Zelle erhalten wird, da beispielsweise keine calyxartigen Synapsen vorliegen, die eine solche Übertragung sicher stellen könnten. Es ist daher offen wie die durch das neuronale Modell geforderten extremen Zeitkonstanten der synaptischen Ströme postsynaptisch erreicht werden könnten, bzw. ob diese überhaupt in der MSO-Zelle vorliegen.

### **2.3 Die Wüstenrennmaus als Tiermodell zur Untersuchung von Schalllokalisationsmechanismen im tieffrequenten Bereich**

Mit zunehmender Entfernung von einer Schallquelle nimmt die Intensität des Schalls und damit der Informationsgehalt des Signals ab. Die räumliche Ausbreitung von Schall hängt dabei besonders von der Temperatur und der relativen Luftfeuchtigkeit ab. Tieffrequente Signale ( $< 3\text{kHz}$ ) werden bei hoher Temperatur und niedriger Luftfeuchtigkeit weit weniger stark abgeschwächt als hochfrequente Signale (ca. 7 – fach; Huang et al. 2002; s.h. auch den Übersichtsartikel Sutherland & Daigle 1997). Daher stellt die Nutzung tiefer Frequenzen in den offenen Landschaften der ariden Steppen- und Wüstengebiete die einzige Möglichkeit dar über große Distanzen zu kommunizieren oder Feinde frühzeitig zu erkennen (s.h. den Übersichtsartikel Webster & Plassmann 1992).

Für die mongolische Wüstenrennmaus *Meriones unguiculatus* (Rodentia,

Cricetidae) als Bewohner der Steppen- und Wüstengebiete der Mongolei und Nordchinas ist es daher von großer Bedeutung tieffrequenten Schall wahrzunehmen und zuverlässig zu lokalisieren. Das Hörsystem der Wüstenrennmaus zeigt, ebenso wie das anderer Wüstenbewohner, typische strukturelle Anpassungen an die Wahrnehmung und Verarbeitung tiefer Frequenzen (Huang et al. 2002; s.h. auch den Übersichtsartikel Webster & Plassmann 1992). So besitzen Wüstenrennmäuse eine im Vergleich zu anderen Nagetieren (z.B. Ratten, Mäusen) überproportional ausgeprägte Mittelohrhöhle (Bulla), ein großes und spezialisiertes Trommelfell, spezifisch angepasste Gehörknöchelchen im Mittelohr, sowie eine vergleichsweise lange Basilarmembran in der Cochlea (Rosowski et al. 1999; Webster & Webster 1975; s.h. auch die Übersichtsartikel Rosowski 1992; Webster & Plassmann 1992). Durch diese strukturellen Anpassungen sind Wüstenrennmäuse in der Lage tiefe Frequenzen bis zu unter 100 Hz wahrzunehmen (Brown 1987; Dallos et al. 1978; Heffner & Heffner 1988; Ryan 1976). Das Audiogramm der Wüstenrennmaus ist daher auch deutlich zu tiefen Frequenzen verschoben, wobei die niedrigsten Schwellen zwischen 0,5 kHz und 20 kHz zu finden sind ( $< 10$  dB SPL; Dallos et al. 1978; Ryan 1976). Wie aus Verhaltensarbeiten hervorgeht, können Wüstenrennmäuse trotz ihrer geringen Kopfgröße verrechenbare ITDs erfahren und diese zur Lokalisation von tieffrequenten Schallquellen nutzen (Heffner & Heffner 1988; Lay 1974).

## **2.4 Räumliche Differenzierung inhibitorischer Eingänge**

Obwohl jedes Neuron innerhalb eines Netzwerks für sich als anatomische und physiologische Einheit betrachtet werden kann, so definieren doch die morphologischen Substrukturen eines Neurons, wie das Soma und die Dendriten, durch ihre unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften maßgeblich die Integration von Signalen und damit das Antwortverhalten der Neurone (s.h. die Übersichtsartikel Häusser 2001; Häusser & Mel 2003; Häusser et al. 2000). Durch eine selektive räumliche Anordnung unterschiedlicher erregender und hemmender Eingänge an den Somata und den Dendriten gliedert sich ein Neuron in verschiedene funktionelle Kompartimente, deren komplexe Interaktionen letztendlich darüber entscheiden, wie ankommende Signale postsynaptisch in der Zelle verarbeitet werden (s.h. die Übersichtsartikel Freund 2003; Häusser 2001; Häusser & Mel 2003; Häusser et al. 2000; Stuart et al. 1997). Für erregende Synapsen ist dabei seit langem etabliert, dass neben den biophysikalischen Membraneigenschaften des Neurons vorallem die elektrotonische Lage der Synapsen die Größe und zeitliche Dauer der exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSPs) und Ströme (EPSCs) am Soma

bestimmt (Jack & Redman 1971; Rall 1967; s.h. auch den Übersichtsartikel Reyes 2001). Im Vergleich zu EPSPs / EPSCs somatischer Synapsen führt dies bei EPSPs / EPSCs dendritischer Synapsen durch transmembrane Leckströme und die passiven Kabeleigenschaften der Dendriten zu einer starken Abschwächung ihrer Amplitude und zu einer merklichen Verlangsamung ihres Zeitverlaufs (Rall 1967; Stuart & Spruston 1998). Da wiederum die Größe und Zeitdauer der EPSPs unter anderem bestimmt welche Zeitspanne für eine Summation von Eingängen zur Verfügung steht und damit auch die zeitliche Präzision der Generierung von Aktionspotentialen festlegt (Fricker & Miles 2000; Galarreta & Hestrin 2001), kommt der räumlichen Anordnung erregender Synapsen eine wichtige Rolle bei der Signalverarbeitung zu (Craig et al. 1993). Wie neuronale Modelle ITD-sensitiver Neurone des Nucleus Laminaris der Vögel vorschlagen, könnte demnach eine räumliche Trennung der binaural erregenden Eingänge auf die bipolaren Dendriten der Neurone entscheidend zur hohen Präzision der Koinzidenzdetektion bei der ITD-Verarbeitung beitragen (Agmon-Snir et al. 1998; Simon et al. 1999). Tatsächlich lässt sich, wie bereits erwähnt (s.h. Kapitel 2.2.2), bei Wüstenrennmäusen (Cant & Hyson 1992; Russell & Moore 1995) und anderen tieffrequent hörenden Säugetieren (Chinchilla: Perkins 1973; Katze: Smith et al. 1993; Stotler 1953; Warr 1966) anatomisch eine Separierung der erregenden Eingänge zu MSO-Neuronen feststellen, wobei die contralateralen Projektionen die medialen Dendriten und die ipsilateralen Projektionen die lateralen Dendriten der bipolaren MSO-Neurone innervieren.

Für inhibitorische Synapsen liegen nur sehr wenige Informationen zur funktionellen Bedeutung einer spezifischen elektrotonischen Position an Neuronen vor (Williams & Stuart 2003). Da die Kabeleigenschaften der Dendriten allerdings weitgehend unabhängig von der Natur des Potentials oder Stroms sind, müssten inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs) und Ströme (IPSCs) in gleicher Weise wie EPSPs / EPSCs beispielsweise einer dendritischen Filterung unterliegen (Larkman et al. 1992; Williams & Stuart 2003; Xiang et al. 2002; s.h. auch den Übersichtsartikel Spruston et al. 1994). Daher sollte, analog zu erregenden Synapsen, auch die räumliche Anordnung inhibitorischer Synapsen einen markanten Einfluss auf das Integrationsverhalten der Neurone bei der Signalverarbeitung ausüben. Anatomisch konnte eine räumliche Differenzierung inhibitorischer Synapsen auf Einzelzellebene bis jetzt nur in wenigen Systemen nachgewiesen werden, beispielsweise an Ganglienzellen der Retina (Lin et al. 2000) und Pyramidenzellen des Hippocampus (Nyiri et al. 2001; s.h. auch den Übersichtsartikel Freund 2003) oder Neocortex (Kawaguchi & Kubota 1997). Speziell an Pyramidenzellen des Hippocampus scheinen die Projektionen verschiedener Populationen



von inhibitorischen, GABAergen Interneuronen räumlich auf die Somata oder Teile der apikalen Dendriten beschränkt zu sein (Maccaferri et al. 2000; Nyiri et al. 2001; s.h. auch den Übersichtsartikel Freund 2003). Obwohl die Funktionen einer solchen Kompartimentierung inhibitorischer Eingänge an Pyramidenzellen des Hippocampus in der Signalverarbeitung noch weitgehend spekulativer Natur sind (Maccaferri et al. 2000; Nyiri et al. 2001; s.h. auch den Übersichtsartikel Freund 2003), so scheint doch eine räumliche Beschränkung dieser Projektionen auf die Somata der Pyramidenzellen durch eine Reduzierung von zeitlicher und räumlicher Summation zu einer schnelleren Kinetik der IPSPs / IPSCs zu führen, wodurch wiederum das Zeitfenster zur Integration erregender Eingänge verkürzt werden kann (Buhl et al. 1994; Miles et al. 1996; Pouille & Scanziani 2001).

Wie bereits dargestellt, ergibt sich als Konsequenz aus ihrer Rolle bei der ITD-Verarbeitung gerade für die glycinerge Inhibition bei MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus die Notwendigkeit einer extrem hohen zeitlichen Präzision und damit einer sehr schnellen Kinetik der IPSPs / IPSCs (s.h. Kapitel 2.2.3.3). Eine Möglichkeit die präzise Zeitstruktur des MNTB-Eingangs postsynaptisch in der MSO-Zelle zu erhalten, könnte nun ebenfalls in einer spezifischen räumlichen Anordnung der inhibitorischen Eingänge liegen. Tatsächlich ergeben sich durch zwei elektronenmikroskopische Untersuchungen an der MSO der Katze (Clark 1969a) und des Chinchillas (Perkins 1973) indirekte Hinweise auf eine spezifische räumliche Anordnung verschiedener morphologisch charakterisierter Synapsentypen. Aus beiden Studien geht hervor, dass sich höchstwahrscheinlich inhibitorische Synapsen anatomisch auf die Somaregion der MSO-Neurone beschränken (Clark 1969a; Perkins 1973). Eine solche räumliche Beschränkung der inhibitorischen Eingänge auf die Somaregion könnte nun, analog zu hippocampalen Pyramidenzellen, durch den Wegfall von dendritischer Filterung funktionell zu einer Verringerung der zeitlichen und räumlichen Summation von IPSPs / IPSCs an der MSO-Zelle führen (Clark 1969a).

## **2.5 Ziel der Arbeit**

Wie eben dargestellt, zeigen höchstwahrscheinlich inhibitorische Eingänge zu MSO-Neuronen der Katze und des Chinchilla anatomisch eine räumliche Beschränkung auf die Somaregion (Clark 1969a; Perkins 1973). Sowohl die Katze, als auch der Chinchilla zeichnen sich zudem durch ein auf die Wahrnehmung tiefer Frequenzen abgestimmtes Hörsystem aus (Chinchilla: Dallos et al. 1978; Heffner & Heffner 1991; Katze: Heffner & Heffner 1985; Neff & Hind 1955) und die MSO-Neurone beider Spezies

können wie MSO-Neurone der Wüstenrennmaus ebenfalls ITDs im  $\mu$ s-Bereich mit hoher zeitlicher Präzision auswerten (Chinchilla: Langford 1984; Katze: Yin & Chan 1990). Wenn nun ein Zusammenhang zwischen der Kompartimentierung der inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen und einer ITD-Sensitivität im  $\mu$ s-Bereich vorliegt, dann würde man erwarten eine solche anatomische Anpassung auch bei MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus zu finden. Es stellt sich daher die Frage, ob die inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus ebenso wie die erregenden Eingänge anatomisch eine spezifische räumliche Anordnung auf Einzelzellniveau zeigen, welche im Fall der Inhibition durch eine Reduzierung von Summationseffekten dazu beitragen könnte, die IPSPs / IPSCs zu verkürzen und die Zeitstruktur des MNTB-Eingangs zu erhalten. Sollte dies zutreffen, ergibt sich als weitere Fragestellung, wie sich eine solche räumliche Differenzierung der inhibitorischen Projektionen zu MSO-Neuronen entwickeln könnte. Aufgrund der bedeutenden Rolle der Inhibition bei der ITD-Verarbeitung ist dabei von besonderem Interesse ob einer solchen Entwicklung ein aktiver Prozess zugrunde liegt, welcher von der Erfahrung binauraler Schallereignisse während der Entwicklung abhängen könnte. Spezifischer ergibt sich daraus die Frage, ob sich eine solche räumliche Differenzierung inhibitorischer Eingänge in Form eines selbstorganisierenden Prozesses, gesteuert durch die Funktion der MSO-Zelle in der ITD-Verarbeitung, entwickeln könnte.

Neben den Neuronen der MSO erhalten auch andere SOC-Nuclei glycinerge Eingänge aus dem MNTB und dem LNTB (s.h. dazu den Übersichtsartikel Thompson & Schofield 2000). Auch bei den Zellen dieser Nuclei spielen die glycinergen Projektionen in der präzisen Verarbeitung von Parametern auditorischer Signale eine bedeutende Rolle, beispielsweise bei der Verarbeitung von ITDs in der LSO (Guinan et al. 1972a,b; Park et al. 1996, 1997) oder bei der Erkennung zeitlicher Muster des Schallsignals im SPN (Behrend et al. 2002). Wenn nun eine mögliche Entwicklung räumlich differenzierter glycinerger Eingänge grundlegend mit der Funktion der MSO in der ITD-Verarbeitung zusammenhängt, bzw. von ihr abhängt, würde man erwarten eine solche räumliche Anpassung der MNTB / LNTB – Projektionen nur an den Neuronen zu finden, die tatsächlich initial ITDs verarbeiten, also bei MSO-Neuronen. Dies führt zwangsläufig zu der Überlegung, ob sich bei Zellen anderer SOC-Nuclei, die nicht an der initialen Verarbeitung von ITDs im  $\mu$ s-Bereich beteiligt sind, beispielsweise der LSO und des SPN, ebenso eine spezifische räumliche Anordnung der inhibitorischen Eingänge zeigen könnte. Tatsächlich gibt es Hinweise, dass eine solche anatomische Anordnung zumindest in der LSO der Katze realisiert sein könnte. Wie elektronenmikroskopische Arbeiten zeigen, finden sich inhibitorische Synapsen bei LSO-Neuronen der Katze

(Cant 1984) und des Meerschweinchens (Helfert et al. 1992) vorallem an den Somata und den wenig verzweigten Hauptästen der Dendriten in der Nähe der Zellkörper.

Wie bereits in Kapitel 2.2.2 erwähnt, findet sich eine MSO auch in Säugetieren, deren Hörsystem nicht auf die Analyse tiefer Frequenzen spezialisiert ist. Ein Beispiel für eine solche Spezies wäre die Ratte. Im Unterschied zu Wüstenrennmäusen verfügen Ratten nicht über spezielle strukturelle Anpassungen des Mittelohrs und der Cochlea, welche spezifisch die Wahrnehmung tiefer Frequenzen ermöglichen würden (Ravicz et al. 1992). Dementsprechend zeigen auch Audiogramme der Ratte keine markante Repräsentation tiefer Frequenzen (unter 2 kHz) sondern sind mehr zu höheren Frequenzen verschoben, wobei der sensitivste Bereich des Hörsystems der Ratte zwischen Frequenzen von 4 kHz bis 45 kHz liegt ( $< 10$  dB SPL; Kelly & Masterton 1977; Zheng et al. 1992). Für die Ratte scheint daher die Wahrnehmung und Verarbeitung tiefer Frequenzen und damit auch die Nutzung von ITDs keine große Verhaltensrelevanz zu besitzen. Aus einer elektrophysiologischen Untersuchung *in vivo* geht zudem hervor, dass die MSO-Neurone der Ratte nur eine sehr begrenzte ITD-Sensitivität aufweisen (Inbody & Feng 1981). Wie aus den Ergebnissen dieser Arbeit abgeleitet werden kann, liegt der steilste Anstieg der ITD-Funktionen bei Ratten-MSO-Neuronen nur zu einem geringen Teil im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs, welchen die Ratte aufgrund ihrer Kopfgröße nutzen könnte (ca. 150  $\mu$ s; s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2000). Da aus den Ergebnissen von Brand et al. (2002) in der MSO der Wüstenrennmaus hervorgeht, dass eine sehr schnelle Kinetik der Inhibition notwendig ist, um die ITD-Funktionen mit dem Maximum ihres dynamischen Bereichs im verhaltensrelevanten Bereich zu plazieren, weisen die Ergebnisse von Inbody & Feng (1981) auf eine möglicherweise eher langsame Kinetik der Inhibition in der Ratten-MSO *in vivo* hin. Wenn nun ein Zusammenhang zwischen einer räumlichen Beschränkung der glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen und der erforderlichen Kinetik der Inhibition *in vivo* bei der ITD-Verarbeitung besteht, dann könnte man vermuten, eine solche Anpassung nur in den Tieren zu finden, deren Hörsystem auf die Analyse tiefer Frequenzen spezialisiert ist und die ITDs zur Lokalisation nutzen können. Infolgedessen stellt sich die Frage, ob sich eine spezifische räumliche Anordnung der glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen auch in den Säugetieren entwickeln könnte, deren Hörsystem hauptsächlich auf die Verarbeitung hochfrequenter Schalle abgestimmt ist und die damit höchstwahrscheinlich keine ITDs nutzen, sondern denen ausreichende IIDs zur Lokalisation einer Schallquelle zur Verfügung stehen.

Wie bereits erwähnt, könnte eine spezifische räumliche Anordnung der

inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen physiologisch zu einer schnellen Kinetik der Inhibition beitragen und damit die Grundlage für die funktional in der ITD-Verarbeitung notwendigen Zeitkonstanten (s.h. Modell in Brand et al. 2002) der postsynaptischen inhibitorischen Potentiale (IPSP) und Ströme (IPSC) legen. Über die Kinetik synaptisch evozierter IPSPs und IPSCs bei MSO-Neuronen tieffrequent hörender und ITDs nutzender Tiere ist bisher nichts bekannt. Lediglich eine *in vitro* Studie (Smith et al. 2000) hat bisher überhaupt die Kinetik glycinерger Inhibition an MSO-Neuronen untersucht. Diese Arbeit (Smith et al. 2000) wurde jedoch an der MSO der Ratte durchgeführt, also an einem Tier, welches nicht auf die Analyse tiefer Frequenzen spezialisiert ist (s.h. oben). Wie bereits erwähnt, weisen die MSO-Neurone der Ratte zudem *in vivo* nur eine sehr begrenzte ITD-Sensitivität (Inbody & Feng 1981) und eine möglicherweise eher langsame Kinetik der glycinерgen Inhibition auf. So sind denn auch die schnellsten Zeitkonstanten, die in dieser Studie (Smith et al. 2000) beschrieben werden, mit ca. 2 ms noch erheblich von dem im Modell für die MSO der Wüstenrennmaus (Brand et al. 2002) geforderten Bereich von hunderten von  $\mu$ s entfernt. Es stellt sich daher die Frage, welche Kinetik die IPSPs und IPSCs in der MSO der Wüstenrennmaus zeigen, bzw. ob sich die geforderten Zeitkonstanten nachweisen lassen. Von Interesse ist in diesem Zusammenhang auch die Entwicklung der Kinetik, denn wenn die Annahme zutrifft, dass der möglichen Entwicklung einer räumlich differenzierten Anordnung der inhibitorischen Eingänge ein erfahrungsabhängiger Prozess zugrundeliegt, dann sollte sich dies auch in der Kinetik niederschlagen und damit physiologisch messbar sein.

Neben den Eigenschaften der Synapsen und ihrer elektrotonischen Lage spielen auch die sog. intrinsischen oder biophysikalischen Membraneigenschaften, also die Ausstattung der Zellen mit Natrium- und Kaliumkanälen eine wichtige Rolle bei der zeitlich präzisen Integration von erregenden wie hemmenden Eingängen (Hooper et al. 2002; s.h. auch die Übersichtsartikel Oertel 1999; Trussell 1999). Wie durch elektrophysiologische Arbeiten *in vitro* (Golding et al. 1999; Oertel 1983; Rothman & Manis 2003a,b) und neuronale Modelle (Rothman & Manis 2003b,c; Rothman et al. 1993) von Zellen des Nucleus Cochlearis (Octopuszellen; GBCs; SBCs) vorschlagen, könnten vorallem spannungsabhängige Kaliumkanäle die Fähigkeit von Neuronen verbessern ein präzises Phasenkopplungsverhalten zu sinoidalen Stimuli zu zeigen. Da eine präzise Phasenkopplung auch bei der ITD-Verarbeitung in der MSO notwendig ist, liegt es nahe, neben den synaptischen Eigenschaften der Inhibition auch die intrinsischen Eigenschaften der MSO-Neurone und ihre Entwicklung zu untersuchen.

Um diesen Fragen nachzugehen wurde im ersten, anatomischen Teil der Arbeit die

qualitative und quantitative Verteilung der drei Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes (präsynaptisches Glycin, postsynaptische Glycinrezeptoren, postsynaptisches Gephyrin) immunhistochemisch an MSO-Neuronen von Wüstenrennmäusen verschiedener Altersstufen, sowie von Wüstenrennmäusen mit manipulierter auditorischer Erfahrung (einseitige Cochleaentnahme vor Hörbeginn) mit Methoden der Lichtmikroskopie untersucht. Daneben wurde die qualitative Verteilung von Glycinrezeptoren und von Gephyrin an LSO- und SPN-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus lichtmikroskopisch untersucht. Stellvertretend für Tiere mit einem nicht auf die Verarbeitung tiefer Frequenzen spezialisierten Hörsystem, wurde die qualitative und quantitative Verteilung von Glycin und Gephyrin immunhistochemisch an MSO-Neuronen von Ratten verschiedener Altersstufen analysiert. Zusätzlich wurde sowohl für Wüstenrennmäuse, als auch für Ratten die Verteilung von postsynaptischem Gephyrin mittels Immunelektronenmikroskopie qualitativ bestimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mit Methoden der *in vitro* Elektrophysiologie an Hirnschnitten sowohl die Entwicklung der intrinsischen Eigenschaften, als auch die Entwicklung des Zeitverhaltens der synaptisch evozierten IPSPs und IPSCs von MSO-Neuronen bei Wüstenrennmäusen verschiedener Altersstufen nach Hörbeginn untersucht.

### 3 Material und Methoden

Die in der Arbeit vorgestellten Daten wurden sowohl mit Methoden der Immunhistochemie, als auch mit Methoden der *in vitro* Elektrophysiologie an Hirnschnitten erhoben.

#### 3.1 Immunhistochemische Methoden

Die präsentierten Ergebnisse der immunhistochemischen Experimente stammen von insgesamt 55 mongolischen Wüstenrennmäusen (*Meriones unguiculatus*, Mongolian Gerbil) und 10 Ratten (Wistar Auszuchtstamm) verschiedener Altersstufen. Das genaue Geburtsdatum neugeborener Jungtiere wurde durch tägliche Kontrolle der Brutkolonie ermittelt. Der Tag des ersten Auffindens von Neugeborenen wurde als Postnataltag 0 (P0) definiert. Gemäss ihres Alters und / oder durchgeführter Vorexperimente, sowie der Tierart wurden die Versuchstiere in fünf experimentelle Gruppen eingeteilt (Tab. 1).

**Tabelle 1:** Einteilung der experimentellen Gruppen

Experimentelle Gruppe	Tierart	Alter der Tiere	Vorexperiment	Summe
Adult	Wüstenrennmaus	P25 oder älter	—	21 Tiere
Jung	Wüstenrennmaus	P10	—	15 Tiere
UCA	Wüstenrennmaus	P25 oder älter	unilaterale Cochleaentnahme an P7 oder P10	19 Tiere
Ratte adult	Wistar Ratte	P60 oder älter	—	5 Tiere
Ratte jung	Wistar Ratte	P10	—	5 Tiere

Die in den immunhistochemischen Experimenten verwendeten Tiere wurden nach Tierart und Alter postnatal (P) in fünf experimentelle Gruppen eingeteilt. Die einseitige Cochleaentnahme bei Tieren der UCA-Gruppe erfolgte immer rechtsseitig (s.h. Kapitel 3.1.1).

##### 3.1.1 Unilaterale Cochleaentnahme

Das einseitige Entfernen der Cochlea folgte der von Sanes et al. (1992a) beschriebenen Methode. Die Entnahme der rechten Cochlea erfolgte entweder am Postnataltag 7 (P7) oder 10 (P10), fünf bzw. zwei Tage vor Beginn des aktiven Hörens bei P12 (Woolf & Ryan 1984, 1985). Pro Operation wurde jeweils ein gesamter Wurf (4 – 8 Tiere) vertäubt. Dazu wurden die Tiere entweder mittels Hypothermie oder durch Methoxyfluran Inhalationsnarkose (Metofane, Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland) betäubt. Sodann wurde die Haut direkt ventrocaudal zur rechten Pinna geöffnet und das unterliegende Fett- und Muskelgewebe vorsichtig zur Seite präpariert bis die Wand der rechten Bulla zu erkennen war. In die freigelegte Bullawandung wurde ein kleines Loch gestochen, durch das eine

stumpfe Kanüle ins Innere der Bulla vorgeschoben wurde. Durch Anlegen von Unterdruck konnte so das sich entwickelnde Mittelohr abgesaugt werden. Nach dem Absaugen des Mittelohrs wurde die Cochlea durch das Loch in der Bulla mit einer Pinzette herausgezogen. Das vermutete Cochleagewebe war meist als dünner heller Faden an der Spitze der Pinzette erkennbar. Um Infektionen zu verhindern und evtl. auftretende Blutungen zu stillen wurden nach der Cochleaentnahme kleine Gelatineschwammstücke (Gelastyp D ½, Hoechst, Frankfurt/Main, Deutschland) in die geöffnete Bulla geschoben, bzw. diese damit verschlossen. Durch Zurückschieben der Muskulatur und des Fettgewebes wurde die Wunde verschlossen. Der äußere Hautschnitt wurde mit sterilem Gewebeklebstoff (Histoacryl, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen. Der Eingriff war in der Regel innerhalb von drei bis fünf Minuten beendet. Nach der Operation erholten sich die Tiere entweder innerhalb weiterer fünf bis zehn Minuten auf einem Heizkissen bei 38°C (Hypothermienarkose) oder innerhalb weniger Sekunden nach Abbruch der Inhalationsnarkose wieder vollständig. Nach maximal einer Stunde befanden sich die Jungen wieder beim Muttertier im Käfig. Das Überleben der operierten Jungtiere wurde während der ersten Woche mehrmals täglich überprüft. Die Tiere wurden dann im Alter von mindestens 25 Tagen postnatal (>P25) für die immunhistochemischen Färbungen präpariert.

Um die erfolgreiche Entnahme der Cochlea zu bestätigen, wurde der Zustand des Innenohrs der operierten Seite während der Präparation des Gehirns für die immunhistochemischen Färbungen untersucht und mit der nichtoperierten Seite verglichen. In allen Fällen erfolgreicher Cochleaentnahme war das Innenohr der operierten Seite entweder nur noch rudimentär vorhanden oder war deutlich geschädigt. Auch fanden sich bei den meisten Tieren Gelatineschwammstücke im Inneren des Innenohrs. Eine Cochlea konnte bei erfolgreich operierten Tieren in keinem Fall gefunden werden. Die Daten, die in der vorliegenden Studie präsentiert werden, stammen ausschließlich von Tieren bei denen eine vollständige Entnahme oder Zerstörung der Cochlea festgestellt werden konnte.

### **3.1.2 Immunhistochemische Färbungen**

Die ausführlichen Protokolle und Arbeitsanweisungen für die verschiedenen immunhistochemischen Methoden können im Kapitel 6 (Anhang zu Material und Methoden) gefunden werden. Im Folgenden werden die verschiedenen durchgeführten Methoden in einer knappen Form zusammengefasst dargestellt.

Vor allen Experimenten wurden die Tiere mit einer letalen Dosis an Chloralhydrat (5%ige Lösung in PBS, 0,01ml / g Körpergewicht) betäubt.

### 3.1.2.1 Glycin Immunhistochemie (Glycin – IHC)

Die immunhistochemische Färbung zum Nachweis des inhibitorischen Neurotransmitters Glycin wurde an insgesamt 20 mongolischen Wüstenrennmäusen aus den verschiedenen experimentellen Gruppen und 2 adulten Ratten durchgeführt (Tab. 2).

**Tabelle 2:** Anzahl der Tiere an denen Glycin – IHC durchgeführt wurde

Experimentelle Gruppe	Adult	Jung	UCA	Ratte adult
Anzahl Tiere (n)	8	4	8	2

Die präsentierten Daten für die Glycin Immunhistochemie stammen von insgesamt 20 Wüstenrennmäusen und 2 Ratten aus den verschiedenen experimentellen Gruppen.

#### *3.1.2.1.1 Doppel – Immunfluoreszenz – Histochemie Glycin und MAP2*

Das ausführliche Protokoll dieser Methode ist in Kapitel 6.1.2 zu finden. Nach der Betäubung wurden die Tiere transcardial zuerst mit einer Ringerlösung, die 0,02% Heparin enthielt, für 5 min, gefolgt von einem Fixativ aus 4% Paraformaldehyd und 0,1% Glutaraldehyd in phosphat-gepufferter Saline (PBS, 0,1 mol, pH 7,4) für weitere 30 min perfundiert. Die Gehirne wurden sofort nach der Perfusion präpariert und in PBS bei 4°C mehrmals gewaschen. Danach wurden die Gehirne in Saccharoselösungen aufsteigender Konzentration (10%, 20%, 30% in PBS) gegen Frostschäden geschützt. Die Gehirne wurden auf Trockeneis gefroren und in einem Kryostaten (CM 3050, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einer Schnittdicke von 25 µm in der coronalen Ebene geschnitten. Ab dem absteigenden Ast des Facialisnervens wurden ca. 40 – 60 coronale Stammhirnschnitte (je nach Größe der MSO) freischwimmend in, mit PBS gefüllten, 24-Loch-Zellkulturplatten gesammelt. Die Färbung der Schnitte wurde freischwimmend in den Zellkulturplatten und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte zur Zerstörung der endogenen Peroxidase für 10 min in 10% Methanol und 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert, danach wieder gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 15 min in 0,1 mol Natriumborohydrid in PBS inkubiert und wieder in PBS, sowie PBS-T (0,04% Triton x 100 in PBS, pH 7,4) gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurden die Schnitte danach für 60 min in einer Lösung von 10% Ziegen-Normalserum („normal goat serum“, NGS; Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,3% Triton x 100 in PBS und für weitere 10 min in 2% NGS und 0,3% Triton x 100 in PBS inkubiert. Zur simultanen Markierung von Glycin und MAP2 wurden die Schnitte für 48 h bei 4°C in einer Lösung primärer Antikörper, bestehend aus dem Glutaraldehyd-gekoppelten



polyclonalen Kaninchen Antikörper gegen Glycin (1:600, SFRI Laboratoire, Saint Jean D'illac, Frankreich), dem monoclonalen Maus Antikörper gegen MAP2 (1:250, clone HM-2, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), sowie 2% NGS und 0,3% Triton x 100 in PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS-T erfolgte eine Inkubation (6 h) in einem Gemisch sekundärer Antikörper, bestehend aus einem Cy3-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen-IgG (1:600, Dianova, Hamburg, Deutschland) und einem Alexa-Fluor-488-gekoppelten Ziege anti-Maus-IgG Antikörper (1:300, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), sowie 2% NGS und 0,3% Triton x 100 in PBS. Nach weiterem Waschen in PBS wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und mit einem anti-fading Einbettmedium (Gel/Mount, Biomedica, Foster City, CA, USA) eingedeckt.

### *3.1.2.1.2 Glycin – IHC mit Di-amino-benzidin (DAB) als Chromogen*

#### **3.1.2.1.2.1 Glycin – DAB – Färbung an Gefrierschnitten**

Die Markierung von Glycin durch DAB-Färbung an Gefrierschnitten (s.h. Kapitel 6.1.2) folgte bis zur Inkubation der sekundären Antikörper dem unter 3.1.2.1.1 dargestellten Protokoll. Inkubiert wurden die Schnitte in diesem Fall ebenfalls für 6 h in einer Lösung aus einem Biotin-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen-IgG (1:300, Dianova, Hamburg, Deutschland) Antikörper, sowie 2% NGS und 0,3% Triton x 100 in PBS. Nach mehrmaligem Waschen in PBS folgte die Durchführung der Standard-Avidin-Biotin-(ABC)-Methode (1:100 in PBS, Vecastain Elite, Vector, Burlingam, CA, USA), sowie die Visualisierung des Reaktionsproduktes durch 0,05% Di-amino-benzidin (DAB, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris-Puffer (0,05 mol, pH 7,4). Nach weiterem Waschen in PBS wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Nach der Entwässerung der Schnitte in der Alkoholreihe wurden sie mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

#### **3.1.2.1.2.2 Glycin – DAB – Färbung an Vibratomschnitten**

Zur Markierung von Glycin durch DAB-Färbung an Vibratomschnitten wurde ein anderes Protokoll verwendet (s.h. Kapitel 6.1.7). Nach der Betäubung wurden die Tiere transcardial zuerst mit einer Ringerlösung, die 0,02% Heparin enthielt, für 5 min, gefolgt von einem Fixativ aus 1% Paraformaldehyd, 2,5% Glutaraldehyd und 1% Natriumdisulfit in PBS (0,05 mol, pH 7,4) für weitere 45 min perfundiert. Die Gehirne wurden sofort nach der Perfusion präpariert und bei 4°C für 5 h im Fixativ nachfixiert, danach über Nacht bei 4°C in PBS (0,1 mol, pH 7,4) gewaschen und in 5% Agar eingebettet. Ab dem absteigenden Ast des Facialisnervens wurden ca. 40 – 60 coronale Stammhirnschnitte (je nach Größe

der MSO) mit einer Schnittdicke von 30 µm mit einem Vibratom (Vibratome Series 1000, Technical Products International, St. Louis, MO, USA) geschnitten und freischwimmend in, mit trisgepuffertem Natriumdisulfit Puffer (TBM, 0,05 mol, pH 7,5) gefüllten, 24-Loch-Zellkulturplatten gesammelt. Die Färbung der Schnitte wurde freischwimmend in den Zellkulturplatten und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach mehrmaligem Waschen in TBM wurden die Schnitte zur Zerstörung der endogenen Peroxidase für 10 min in 10% Methanol und 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert, danach wieder gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in 0,1 mol Natriumborohydrid in TBM inkubiert und wieder mehrmals in TBM gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Schnitte danach für 60 min in einer Lösung von 10% NGS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,3% Triton x 100 in TBM und für weitere 10 min in 2% NGS und 0,3% Triton x 100 in TBM inkubiert. Zur Markierung von Glycin wurden die Schnitte für min. 12 h bei 4°C in der primären Antikörperlösung bestehend aus dem Glutaraldehyd-gekoppelten, polyclonalen Kaninchen Antikörper gegen Glycin (1:15000, SFRI Laboratoire, Saint Jean D'illac, Frankreich) und 2% NGS in TBM inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in trisgepuffelter Saline (TBS, 0,05 mol, pH 7,5) erfolgte die Inkubation (6 h) in der sekundären Antikörperlösung, bestehend aus dem Biotin-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:200, Dianova, Hamburg, Deutschland) und 2% NGS in TBS. Nach mehrmaligem Waschen in TBS folgte die Durchführung der Standard-Avidin-Biotin-(ABC)-Methode (1:100 in TBS, Vecastain Elite, Vector, Burlingam, CA, USA), sowie die Visualisierung des Reaktionsprodukts durch 0,05% DAB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBS. Nach weiterem Waschen in PBS (0,1 mol, pH 7,4) wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Nach der Entwässerung der Schnitte in der Alkoholreihe wurden sie mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

### 3.1.2.2 Glycinrezeptor Immunhistochemie (Glycinrezeptor – IHC)

Die immunhistochemische Färbung zum Nachweis von Glycinrezeptoren wurde an insgesamt 11 mongolischen Wüstenrennmäusen aus den verschiedenen experimentellen Gruppen durchgeführt (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Anzahl der Tiere an denen Glycinrezeptor – IHC durchgeführt wurde

Experimentelle Gruppe	Adult	Jung	UCA
Anzahl Tiere (n)	5	3	3

Die präsentierten Daten für die Glycinrezeptor Immunhistochemie stammen von insgesamt 11 Tieren aus den verschiedenen experimentellen Gruppen

#### **3.1.2.2.1 Doppel – Immunfluoreszenz – Histochemie Glycinrezeptor und MAP2**

Das ausführliche Protokoll dieser Methode ist in Kapitel 6.1.3 zu finden. Nach der Betäubung wurden die Tiere für 5 min transcardial mit einer künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit (ACSF), die (in mmol): 125,0 NaCl, 4,0 KCl, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,3 MgSO<sub>4</sub>, 26,0 NaHCO<sub>3</sub>, 15,0 Glucose, 2,4 CaCl<sub>2</sub> und 0,08 Ascorbinsäure, sowie 0,02% Heparin enthielt, perfundiert. Die Gehirne wurden sofort nach der Perfusion präpariert, in Isopentan in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert. Ab dem absteigenden Ast des Facialisnervens wurden ca. 40 – 60 coronale Stammhirnschnitte (je nach Größe der MSO) mit einer Schnittdicke von 25 µm in einem Kryostaten (CM 3050, Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt, sofort auf gelatinebeschichtete Objektträger tauend aufgezogen und für 5 min in 4% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Danach wurden die Schnitte mehrmals in PBS (0,1 mol, pH 7,4) gewaschen. Die Färbung der Schnitte wurde direkt auf dem Objektträger in einer feuchten Kammer und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 10 min in 10% Methanol und 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert, danach wieder gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Schnitte danach für 60 min in einer Lösung von 10% NGS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,5% Triton x 100 in PBS und für weitere 10 min in 2% NGS und 0,5% Triton x 100 in PBS inkubiert. Zur simultanen Markierung von Glycinrezeptoren und MAP2 wurden die Schnitte für mindestens 12 h bei 4°C in einer Lösung primärer Antikörper, bestehend aus dem polyclonalen Kaninchen Antikörper gegen die  $\alpha$ 1-Untereinheit des Glycinrezeptors (1:100, Chemicon International, Temecula, CA, USA), dem monoclonalen Maus Antikörper gegen

MAP2 (1:100, clone HM-2, Sigma, Deisenhofen, Deutschland), sowie 2% NGS und 0,5% Triton x 100 in PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS erfolgte eine Inkubation (60 min) in einem Gemisch sekundärer Antikörper, bestehend aus einem Cy3-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen-IgG (1:300, Dianova, Hamburg, Deutschland) und einem Alexa-Fluor-488-gekoppelten Ziege anti-Maus-IgG Antikörper (1:200, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), sowie 2% NGS in PBS. Nach weiterem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit einem anti-fading Einbettmedium (Gel/Mount, Biomedica, Foster City, CA, USA) eingedeckt.

#### *3.1.2.2.2 Glycinrezeptor – IHC mit Di-amino-benzidin (DAB) als Chromogen*

Die Markierung von Glycinrezeptoren durch DAB-Färbung (s.h. Kapitel 6.1.3) folgte bis zur Inkubation des primären Antikörpers dem unter 3.1.2.2.1 dargestellten Protokoll. Inkubiert wurden die Schnitte in diesem Fall ebenfalls für mindestens 12 h in einer Lösung aus dem polyclonalen Kaninchen Antikörper gegen die  $\alpha 1$ -Untereinheit des Glycinrezeptors (1:175, Chemicon International, Temecula, CA, USA) sowie 2% NGS und 0,5% Triton x 100 in PBS. Nach mehrmaligem Waschen in PBS erfolgte eine Inkubation (60 min) in der sekundären Antikörperlösung, bestehend aus einem Biotin-gekoppelten Ziege anti-Kaninchen-IgG Antikörper (1:300, Dianova, Hamburg, Deutschland) und 2% NGS in PBS. Nach weiterem Waschen in PBS folgte die Durchführung der Standard-Avidin-Biotin-(ABC)-Methode (1:100 in PBS, Vecastain Elite, Vector, Burlingame, CA, USA), sowie die Visualisierung des Reaktionsproduktes durch 0,05% DAB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,01%  $H_2O_2$  in Tris-Puffer (0,05 mol, pH 7,4). Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in der Alkoholreihe entwässert und mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

### 3.1.2.3 Gephyrin Immunhistochemie (Gephyrin – IHC)

Die immunhistochemische Färbung zum Nachweis von Gephyrin wurde an insgesamt 24 mongolischen Wüstenrennmäusen aus den verschiedenen experimentellen Gruppen sowie 3 adulten und 5 jungen (P10) Ratten durchgeführt (Tab. 4).

**Tabelle 4:** Anzahl der Tiere an denen Gephyrin – IHC durchgeführt wurde

Experimentelle Gruppe	Adult	Jung	UCA	Ratte adult	Ratte jung
Anzahl Tiere (n)	8	8	8	3	5

Die präsentierten Daten für die Gephyrin Immunhistochemie stammen von insgesamt 24 Wüstenrennmäusen sowie 8 Ratten aus den verschiedenen experimentellen Gruppen.

#### *3.1.2.3.1 Einfach – Immunfluoreszenz – Histochemie Gephyrin*

Das ausführliche Protokoll dieser Methode ist in Kapitel 6.1.4 zu finden. Nach der Betäubung wurden die Tiere transcardial zuerst mit einer Ringerlösung, die 0,02% Heparin enthielt, für 5 min, gefolgt von einem Fixativ aus 4% Paraformaldehyd in PBS (0,1 mol, pH 7,4) für weitere 45 min perfundiert. Die Gehirne wurden sofort nach der Perfusion präpariert und bei 4°C für 30 min im Fixativ nachfixiert, danach zwei mal für je 30 min in PBS gewaschen und in Saccharoselösungen aufsteigender Konzentration (10%, 20%, 30% in PBS) gegen Frostschäden geschützt. Die Gehirne wurden auf Trockeneis gefroren und entweder in einem Kryostaten (CM 3050, Leica, Wetzlar, Deutschland) oder am Gefrierschlittenmikrotom (HM400R, Microm, Walldorf, Deutschland) mit einer Schnittdicke von 25 µm in der coronalen Ebene geschnitten. Ab dem absteigenden Ast des Facialisnervens wurden ca. 40 – 60 coronale Stammhirnschnitte (je nach Größe der MSO) freischwimmend in, mit PBS gefüllten, 24-Loch-Zellkulturplatten gesammelt. Je zwei Schnitte wurden auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen, die Färbung der Schnitte fand direkt auf dem Objektträger in einer feuchten Kammer und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur statt.

Zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität wurden die Schnitte für 10 min in 10% Methanol und 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert, danach wieder gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurden die Schnitte dann für 60 min in einer Lösung von 10% NGS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,05% Triton x 100 in PBS und für weitere 10 min in 2% NGS und 0,05% Triton x 100 in PBS inkubiert. Zur Markierung von Gephyrin wurden die Schnitte für mindestens 12 h bei 4°C in der primären Antikörperlösung, bestehend aus dem monoklonalen Maus Antikörper gegen Gephyrin (1:500, mAb7a, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), sowie 2% NGS und 0,05%

Triton x 100 in PBS inkubiert. Zur Verstärkung des Signals wurde im weiteren Verlauf der Färbung ein Tyramide-Biotin Signalverstärkungs-Kit (TSA-Kit, NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) angewandt. Nach mehrmaligem Waschen in TNT-Puffer (TSA-Kit) erfolgte eine Inkubation (60 min) in der sekundären Antikörperlösung, bestehend aus einem Biotin-gekoppelten Ziege anti-Maus-IgG Antikörper (1:500, Dianova, Hamburg, Deutschland) und 2% NGS in TNT. Nach weiterem Waschen in TNT wurden die Schnitte zur Blockierung einer unspezifischen Bindung des Tyramids für 30 min in TNB-Puffer (TSA-Kit) und anschließend für 30 min im ABC-Kit (1:500 in TNB, Vecastain Elite, Vector, Burlingam, CA, USA) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in TNT wurden die Schnitte für 10 min in Tyramide-Biotin (1:100, TSA-Kit) in amplification diluent (TSA-Kit) inkubiert. Es folgte weiteres Waschen in TNT und ein weiterer Blockierungsschritt (30 min) in TNB. Zur Visualisierung des Reaktionsproduktes wurden die Schnitte für 30 min in einer quartären Antikörperlösung aus Cy3-gekoppeltem Streptavidin (1:1000, Dianova, Hamburg, Deutschland) in TNB inkubiert. Die wiederum in TNT und PBS gewaschenen Schnitte wurden danach mit einem anti-fading Einbettmedium (Gel/Mount, Biomedica, Foster City, CA, USA) eingedeckt.

### *3.1.2.3.2 Gephyrin – IHC mit Di-amino-benzidin (DAB) als Chromogen*

#### **3.1.2.3.2.1 Gephyrin – DAB – Färbung an Gefrierschnitten**

Die Markierung von Gephyrin durch DAB-Färbung an Gefrierschnitten (s.h. Kapitel 6.1.4) folgte bis zur Inkubation in der quartären Antikörperlösung dem unter 3.1.2.3.1 dargestellten Protokoll. Durchgeführt wurde in diesem Fall eine weitere Inkubation (30 min) im ABC-Kit (1:500 in TNB, Vecastain Elite, Vector, Burlingam, CA, USA), sowie die Visualisierung des Reaktionsproduktes durch 0,05% DAB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TNT. Nach weiterem Waschen in PBS wurden die Schnitte in der Alkoholreihe entwässert und mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

#### **3.1.2.3.2.2 Gephyrin – DAB – Färbung an Vibratomschnitten**

Zur Markierung von Gephyrin durch DAB-Färbung an Vibratomschnitten wurde ein anderes Protokoll verwendet (s.h. Kapitel 6.1.5). Nach der Betäubung wurden die Tiere transcardial zuerst mit einer Ringerlösung, die 0,02% Heparin enthielt, für 5 min, gefolgt von einem Fixativ aus 4% Paraformaldehyd, 0,2% Glutaraldehyd und 0,2% Pikrinsäure in PBS (0,1 mol, pH 7,4) für weitere 45 min perfundiert. Die Gehirne wurden sofort nach der Perfusion präpariert und bei 4°C für 5 h im Fixativ nachfixiert, danach über Nacht bei

4°C in PBS gewaschen und in 5% Agar eingebettet. Ab dem absteigenden Ast des Facialisnervens wurden ca. 40 – 60 coronale Stammhirnschnitte (je nach Größe der MSO) mit einer Schnittdicke von 30 µm mit einem Vibratom (Vibratome Series 1000, Technical Products International, St. Louis, MO, USA) geschnitten und freischwimmend in, mit PBS gefüllten, 24-Loch-Zellkulturplatten gesammelt. Die Färbung der Schnitte wurde freischwimmend in den Zellkulturplatten und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt.

Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität für 10 min in 10% Methanol und 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert, danach wieder gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in 0,1 mol Natriumborohydrid in PBS inkubiert und wieder in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren wurden die Schnitte dann für 60 min in einer Lösung von 10% NGS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,1% Triton x 100 in PBS inkubiert. Zur Markierung von Gephyrin wurden die Schnitte für mindestens 12 h bei 4°C in der primären Antikörperlösung, bestehend aus dem monoclonalen Maus Antikörper gegen Gephyrin (1:100, mAb7a, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA), sowie 2% NGS und 0,1% Triton x 100 in PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation (3 h) in der sekundären Antikörperlösung, bestehend aus einem Biotin-gekoppelten Ziege anti-Maus-IgG Antikörper (1:200, Dianova, Hamburg, Deutschland) und 2% NGS in PBS. Nach mehrmaligem Waschen in PBS folgte die Durchführung der Standard-Avidin-Biotin-(ABC)-Methode (1:100 in PBS, Vecastain Elite, Vector, Burlingam, CA, USA), sowie die Visualisierung des Reaktionsproduktes durch 0,05% DAB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris-Puffer (0,05 mol, pH 7,4). Nach weiterem Waschen wurden die Schnitte auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und getrocknet. Nach der Entwässerung der Schnitte in der Alkoholreihe wurden sie mit Entellan (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

### 3.1.2.3.3 Gephyrin Immun – Elektronenmikroskopie (EM)

Um die Verteilung von Gephyrin – immunopositiven Clustern auf der ultrastrukturellen Ebene zu analysieren wurde eine sog. „preembedding“ (PE) Immunhistochemie an adulten ( $n = 1$ ) und jungen ( $n = 2$ ) Wüstenrennmäusen sowie an adulten ( $n = 1$ ) und jungen ( $n = 1$ ) Ratten durchgeführt. Bei dieser Methode wird das Antigen vor der Kunststoffeinfbettung und dem Anfertigen der Ultradünnschnitte mit Techniken, die auch in der Lichtmikroskopie zum Einsatz kommen, angefärbt. Das ausführliche Protokoll dieser Methode ist in Kapitel 6.1.6 zu finden. An einigen Arbeitsschritten während der Präparation

des Gewebes von Wüstenrennmäusen für die Elektronenmikroskopie wirkte auch A. H. Seidl (Max-Planck-Institut für Neurobiologie) mit.

Nach der Betäubung wurden die Tiere transcardial zuerst mit einer Ringerlösung, die 0,02% Heparin enthielt, für 5 min, gefolgt von einem Fixativ aus 4% Paraformaldehyd und 0,4% Glutaraldehyd in PBS (0,1 mol, pH 7,4) für weitere 45 min perfundiert. Die Gehirne wurden sofort nach der Perfusion präpariert und bei 4°C für 4 h im Fixativ nachfixiert, danach über Nacht bei 4°C in PBS gewaschen und in 5% Agar eingebettet. Ab dem absteigenden Ast des Facialisnervens wurden ca. 10 – 18 coronale Stammhirnschnitte (je nach Größe der MSO) mit einer Schnittdicke von 100 µm mit einem Vibratom (Vibroslice 752M, Campden Instruments, Loughborough, England) geschnitten und freischwimmend in, mit PBS (gekühlt 4°C) gefüllten, 24-Loch-Zellkulturplatten gesammelt. Die Färbung der Schnitte wurde freischwimmend in den Zellkulturplatten und wenn nicht anders angegeben bei 4°C durchgeführt, desweiteren wurde bei dieser Färbung kein Triton x 100 zur Permeabilisierung der Membranen eingesetzt.

Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität für 10 min in 10% Methanol und 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert, danach wieder gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 30 min in 0,05 mol Natriumborohydrid in PBS inkubiert und wieder in PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu blockieren, wurden die Schnitte dann für 60 min in einer Lösung von 10% NGS (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in PBS inkubiert. Zur Markierung von Gephyrin wurden die Schnitte für mindestens 16 h in der primären Antikörperlösung, bestehend aus dem monoclonalen Maus Antikörper gegen Gephyrin (1:100, mAb7a, Alexis Biochemicals, San Diego, CA, USA) und 10% NGS in PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation (3 h) in der sekundären Antikörperlösung, bestehend aus einem Biotin gekoppelten Ziege anti-Maus-IgG Antikörper (1:200, Dianova, Hamburg, Deutschland) und 2% NGS in PBS. Nach mehrmaligem Waschen in PBS folgte die Durchführung der Avidin-Biotin-(ABC)-Methode (1:100 in PBS, Vecastain Elite, Vector, Burlingam, CA, USA) für 3 h, sowie die Visualisierung des Reaktionsproduktes durch 0,05% DAB (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Tris-Puffer (0,05 mol, pH 7,4) bei Raumtemperatur. Nach weiterem Waschen wurden die Schnitte für mindestens 7 Tage in 2% Glutaraldehydlösung (nach Barnett) nochmals fixiert.

Die Einbettung der Schnitte in Kunststoff und das Anfertigen der Ultradünnschnitte wurde in Zusammenarbeit mit der Histologie – Servicegruppe am Max-Planck-Institut für Neurobiologie durchgeführt. Unter einem Binokular (Wild, Heerbrugg, Schweiz) wurden



die verwendeten SOC-Kerngebiete mit einem Skalpell ausgeschnitten, und in Dalton-Lösung I osmifiziert. In einer Alkoholreihe und Propylenoxid wurden die Schnitte anschließend vollständig entwässert und in Araldit (Fluka, Basel, Schweiz) flach eingebettet. Nach der Polymerisation des Araldits wurden die Blöckchen mit den Schnitten getrimmt und mit einem Diamantmesser (Diatome, Biel, Schweiz) an einem Ultramikrotom (LKB UM3, Bromma, Schweden) mit einer Schnittdicke von 1 µm (Semidünnschnitte) oder 50 – 100 nm (Ultradünnschnitte) geschnitten. Für lichtmikroskopische Untersuchungen wurden die Semidünnschnitte mit einer Methylenblaulösung (Richardson-Färbung) gegengefärbt, auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen, getrocknet und mit Paraffinöl eingedeckt. Die Ultradünnschnitte wurden mit einer Wimper auf, mit Formvar beschichtete, Nickelgrids aufgezogen sowie zur Kontrastierung mit Uranylacetat und Bleicitrat gegengefärbt.

#### 3.1.2.4 Immunhistochemischer Nachweis der mit Neurobiotin gefüllten Zellen aus den *in vitro* Experimenten

Das ausführliche Protokoll dieser Methode ist im Anhang unter Punkt 6.1.9 zu finden. Während der *in vitro* Ableitungen wurden die MSO-Zellen mit Neurobiotin (Biocytinderivat, s.h. Kapitel 3.2.3) gefüllt. Die Hirnschnitte wurden danach in 4% Paraformaldehyd in PBS (0,1 mol, pH 7.4) für mindestens 5 Tage bei 4°C fixiert. Zur Durchführung der immunhistochemischen Nachweisreaktion für Neurobiotin wurden die Hirnschnitte nicht weiter geschnitten, sondern es wurden die gesamten Hirnschnitte (250 – 350 µm) verwendet. Die Reaktion wurde freischwimmend in 24-Loch-Zellkulturplatten und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte zur Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität für 15 min in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS inkubiert, danach wieder gewaschen. Zur Permeabilisierung des Gewebes wurden die Schnitte danach in 3% Triton x 100 in PBS für mindestens 12 h bei 4°C inkubiert. Nach einmaligem Waschen in PBS erfolgte, zur Blockierung von unspezifischen Bindungen, eine Inkubation (2 h) in 5% NGS und 2% Triton x 100 in PBS. Zur fluoreszenten Markierung von Neurobiotin wurden die Schnitte dann in einer Antikörperlösung bestehend aus einem Cy3-gekoppelten Streptavidin (1:800, Dianova, Hamburg, Deutschland) in PBS für 2 h inkubiert. Nach weiterem Waschen in PBS wurde an manchen Schnitten zur Identifizierung der Lage der Zellen entweder eine DAPI-Kernfärbung (Chromosomen-Markierung) oder eine fluoreszente Nisslfärbung durchgeführt. Für diese Art der Markierung wurden die Schnitte entweder für 10 min in DAPI (1:1000, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) und 0,5% Triton x 100 in PBS, oder

für 20 min in NeuroTrace 500/525 green fluorescent Nissl stain (1:350, Molecular Probes) in PBS inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte dann auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgezogen und mit einem anti-fading Einbettmedium (Gel/Mount, Biomedica, Foster City, CA, USA) eingedeckt. Um die dreidimensionale Struktur der markierten Zellen zu erhalten wurde das Deckglas nur leicht, ohne Druck, aufgelegt und der Raum zwischen Objektträger und Deckglas mit Einbettmedium aufgefüllt.

### **3.1.3 Mikroskopische Analyse der immunhistochemischen Färbungen**

Die Verteilung der immunhistochemisch markierten Bestandteile glycinерger Synapsen wurde mit Methoden der Fluoreszenz-Lichtmikroskopie, der Hellfeld-Lichtmikroskopie und der Transmissions-Elektronenmikroskopie untersucht. Die Abgrenzung der Kerngebiete des SOC's erfolgte nach den in der Literatur vorgeschlagenen Kriterien (Wüstenrennmaus: Loskota et al. 1974; Nordeen et al. 1983; Ratte: Paxinos & Watson 1986).

#### **3.1.3.1 Lichtmikroskopische Analyse von fluoreszent markiertem Gewebe**

Die Analyse der Fluoreszenzfärbungen erfolgte an einem konfokalen Laser-scanning-Mikroskop (TCS 4D, Leica, Wetzlar, Deutschland). Zum Auffinden und Abgrenzen der Kerngebiete des SOC's wurden die Schnitte zuerst mit der Standard-Epifluoreszenzeinrichtung des Mikroskops (Leitz DM IRB) untersucht. Für den Fluoreszenzfarbstoff Alexa-Fluor-488 (grün) wurde dabei der Filtersatz Leica I1, für den Fluoreszenzfarbstoff Cy3 (rot) der Filtersatz Leica N2.1 verwendet. Nach dem Auffinden der Kerngebiete wurden digitale Bilder (1024 x 1024 Pixel, 8-Bit Graustufen) der Fluoreszenz mit der konfokalen Laser-Technik bei verschiedenen Vergrößerungsstufen (25x, 40x, 63x Objektiv, s.h. Tab. 5) aufgenommen. Die Immunfluoreszenz wurde durch einen ArKr-Laser bei niedriger Laserintensität (0,25 V) simultan mit einer Wellenlänge von 488 nm für Alexa-Fluor-488 und 568 nm für Cy3 angeregt, sowie durch einen BP-FITC (Alexa-Fluor-488) und einen LP590 Barrierefilter (Cy3) detektiert. Die Verstärkungsspannung des Detektors (Photomultiplier) und die Verschiebung (Offset) der Emissionsstrahlen wurde dabei für jeden Kanal (grün / rot) bei jeder Vergrößerungsstufe sowie jedem neuen Schnitt mittels der Steuerungssoftware (Scanware 5.01, Leica) so angepasst, dass ein einmal definiertes Signal / Rauschkriterium erfüllt wurde. Um

unspezifisches Rauschen durch den Photomultiplier in den digitalen Bildern weiter zu minimieren, wurden die Pixel eines optischen Schnittes während der Aufnahme durch einen 8x-line-Algorithmus gemittelt. Durch die verwendeten Objektive ergaben sich verschiedene räumliche Auflösungen der Bilder in der horizontalen (x-y) Ebene (s.h. Tab. 5). Unabhängig davon, wurden pro Schnitt bis zu 25 digitale, optische Schnitte (in der x-y Ebene) durch das Präparat mit einem Abstand von 1  $\mu\text{m}$  in der vertikalen (z) Ebene aufgenommen. Von jedem untersuchten Schnittpräparat und jedem beteiligten Fluoreszenzfarbstoff wurden so digitale Bildserien mit einer bestimmten x-y Ausdehnung angefertigt. Die Anzahl der Bilder pro Serie entsprach dabei der Anzahl der optischen Schnitte in der z-Ebene.

**Tabelle 5:** Verwendete Objektive und resultierende räumliche Auflösung

Objektiv	PL Fluotar 25 / 0,75	PL Fluotar 40 / 1,00	PL Apo 63 / 1.40
Ausschnitt x-y Ebene	400 x 400 $\mu\text{m}$	250 x 250 $\mu\text{m}$	158,73 x 158,73 $\mu\text{m}$
Räumliche Auflösung	391 nm / pixel	244 nm / pixel	155 nm / pixel

Die Tabelle stellt die räumliche Auflösung und damit die Größe des Bildausschnitts für die verwendeten Objektive bei einem optischen Schnitt in der x-y Ebene bei einer Bildgröße von 1024 x 1024 Pixeln dar.

Zusätzlich wurden alle Einzelbilder einer digitalen Bildserie für jede Fluoreszenzwellenlänge mittels des Maximum-Intensity-Algorithmuses (Scanware 5.01, Leica) wieder auf eine Bildebene projiziert. Dieser Algorithmus entspricht einer Camera-Lucida Projektion (Kalla et al. 2001), dabei wird der Wert mit der maximalen Intensität für jedes Pixel aus den Pixelintensitäten der vorhandenen optischen Schnitte ausgewählt und dem Pixel in der entsprechenden x-y Koordinate des Projektionsbildes zugewiesen.

Die Bildserien sowie die korrespondierenden Maximum-Intensity-Projektionen (MIPs) wurden auf einem Standard-Computer im TIFF-Bildformat abgespeichert und mit Adobe Photoshop Software (Version 5.0.2, Adobe Systems, San Jose, CA, USA) bearbeitet. Zur Bearbeitung der Graustufenbilder wurden die einzelnen optischen Schnitte und die Maximum-Intensity-Projektionen zuerst um 90° rotiert und danach in einen Falschfarbencode (RGB-Farbstandard) überführt, um die unterschiedlichen Färbungen mit einer bestimmten, in der Folge für diese Färbung charakteristischen, Farbe zu versehen (Tab. 6). Nach der Falschfarbenzuweisung wurden die Pixelwerte der einzelnen Bilder einer Bildserie in ihrer Intensität sowie in Helligkeit und Kontrast angepasst, dabei wurden alle Bilder einer bestimmten immunhistochemischen Färbung immer um dieselben Werte verändert.

**Tabelle 6:** Falschfarbencode zur Unterscheidung der immunhistochemischen Färbungen

Immunhistochemische Färbung	Glycin	Glycinrezeptor	Gephyrin	MAP2
Falschfarbe	Rot	Gelb	Grün	Blau

Zur einfacheren Identifizierung des markierten Proteins und zur Erhöhung des Farbkontrastes bei Doppelfärbungen wurden den verschiedenen immunhistochemischen Färbungen in Adobe Photoshop Software charakteristische Falschfarben zugewiesen.

Zur Analyse der Verteilung der Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes (s.h. auch Kapitel 3.1.4) sowie zur Erstellung der Abbildungen wurden für Einfachfärbungen mehrere optische Schnitte einer Bildserie, für Doppelfärbungen korrespondierende optische z-Ebenenschnitte der Bildserien beider Fluoreszenzkanäle in ihren Pixelwerten addiert und wieder zu einem Bild zusammengefasst. Alternativ wurden für manche Abbildungen die MIP-Darstellungen der Fluoreszenzkanäle direkt verwendet (Einfachfärbungen), oder die korrespondierenden MIP-Darstellungen der Kanäle addiert (Doppelfärbungen).

### 3.1.3.2 Lichtmikroskopische Analyse von DAB-markiertem Gewebe

Die Analyse der DAB-gefärbten Schnitte erfolgte an einem Zeiss Axiophot und einem Reichert & Jung Polyvar Lichtmikroskop im Hellfeldmodus unter Verwendung verschiedener Vergrößerungsstufen (50-fache bis 1250-fache tatsächliche Objektvergrößerung). Die Feinanalyse der Verteilung glycinerner Synapsen erfolgte unter der maximal möglichen Vergrößerung (1250-fach).

Zur späteren Auswertung wurden die markierten Schnitte zum einen mit einer am Mikroskop angebrachten Kamera (Leica) bei verschiedenen Vergrößerungen (18-fache, 56,25-fache, 281,25-fache tatsächliche Vergrößerung in der Kameraebene) auf einem Kunstlichtdiafilm (Kodak EPY 64T) fotografiert, zum anderen wurden digitale Bilder mit einer CCD-Kamera (Zeiss AxioCam HR, Axiovision 3.0 Software) bei verschiedenen Vergrößerungen (31-fache, 124-fache, 390,6-fache, 620-fache tatsächliche Vergrößerung in der Kameraebene) aufgenommen und im TIFF-Bildformat abgespeichert. Einzelne MSO-Zellen wurden zur Analyse der Verteilung Glycin-positiver (Wüstenrennmaus) und Gephyrin-positiver Punkte (Ratte) mittels eines am Mikroskop angebrachten Zeichentubuses bei einer 1125 – 1600-fachen Gesamtvergrößerung maßstabsgetreu vom Schnitt abgezeichnet (s.h. auch Kapitel 3.1.4.1). Die Größeneichung der Fotos und Zeichnungen erfolgte mit einem geeichten Maßstab.

Die aufgenommenen Fotos und Zeichnungen wurden mit einem Dia- (Polaroid SprintScan 35) oder Flachbettscanner (HP ScanJet 5370C) an einem Computer digitalisiert und im TIFF-Bildformat abgespeichert. Zur Hervorhebung der gefärbten Strukturen

wurden die digitalisierten Fotos in Helligkeit, Kontrast, Farbkontrast und Farbsättigung angepasst (Adobe Photoshop 5.0.2).

### **3.1.3.3 Elektronenmikroskopische Analyse**

Die Ultradünnschnitte wurden an einem Zeiss EM 10 Transmissions-Elektronenmikroskop bei 2500-facher – 25500-facher Vergrößerung untersucht. Übersichts- und Detailansichten von Zellkörpern, Dendriten und Synapsen der MSO-Zellen wurden auf Fotoplatten aufgenommen. Bei der Entwicklung und der Erstellung von Papierabzügen wurden die Fotos 2,5-fach nachvergrößert. Die, durch die Gephyrinfärbung markierten postsynaptischen Orte konnten als stark elektronendichte (dunkle) Ablagerungen von DAB eindeutig von den weniger elektronendichten und damit helleren Strukturen des Cytoplasmas unterschieden werden.

Zur Erstellung der Abbildungen wurden die Fotos mit einem Flachbettscanner (HP ScanJet 5370C) an einem Computer digitalisiert, im TIFF-Bildformat abgespeichert, sowie in Helligkeit und Kontrast angepasst (Adobe Photoshop 5.0.2).

## **3.1.4 Quantifizierung der Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Zellen der Wüstenrennmaus**

Um eine Veränderung in der Verteilung glycinерger Synapsen in Abhängigkeit vom Alter, der Hörerfahrung oder der „Hörwelt“, also zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen, numerisch zu ermitteln und statistisch auf ihre Signifikanz zu prüfen, wurden die Punktaverteilungen von Glycin, Gephyrin und Glycinrezeptoren an MSO-Neuronen durch verschiedene Methoden der Quantifizierung bestimmt. Die Verteilungen wurden sowohl durch direktes Zählen der Punkte per Hand (s.h. Kapitel 3.1.4.1 – 3), als auch durch automatisierte Zählalgorithmen (s.h. Kapitel 3.1.4.4 – 5) bestimmt.

### **3.1.4.1 Quantifizierung der Verteilung Glycin- und Gephyrin-positiver Punkte auf einzelnen MSO-Neuronen**

An einzelnen Neuronen wurde die Dichte von Glycin und Gephyrin positiven Punkten pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran am Zellkörper bestimmt und mit der Punktdichte in  $10\ \mu\text{m}$  Membranabschnitten (entspricht  $20\ \mu\text{m}$  Membran) an den Dendriten verglichen. Die präsentierten Daten setzen sich wie in Tabelle 7 dargestellt zusammen.

**Tabelle 7:** Einteilung und Herkunft der analysierten Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung Glycin- und Gephyrin-positiver Punkta an einzelnen MSO-Somata und Dendriten

Experimentelle Gruppe	Adult	Jung	UCA	Ratte adult	Ratte jung
Anzahl Tiere (Glycin)	5	2	4	2	—
Anzahl MSO-Zellen (Glycin)	87	88	81	50	—
Anzahl untersuchter Gehirnschnitte (Glycin)	43	40	12	21	—
Anzahl Tiere (Gephyrin)	—	—	—	2	4
Anzahl MSO-Zellen (Gephyrin)	—	—	—	50	50
Anzahl untersuchter Gehirnschnitte (Gephyrin)	—	—	—	17	15

Die gezeigten Daten zur Verteilung Glycin-positiver Punkta stammen von insgesamt 11 Wüstenrennmäusen sowie 6 Ratten aus den verschiedenen experimentellen Gruppen. Die Verteilung Gephyrin-positiver Punkta auf Einzelzellen wurde nur bei adulten ( $n = 2$ ) und jungen ( $n = 4$ ) Ratten bestimmt. Die Zahl der untersuchten Zellen bezieht sich auf Zelleinheiten (Soma und Dendriten), eine Zelleinheit besteht aus einem Soma und bis zu 12 Dendritenabschnitten. Die Relation der Punktaverteilung Soma / Dendritenabschnitte wurde jeweils für eine Zelleinheit berechnet. Die untersuchten Zellen wurden statistisch entlang der gesamten rostro – caudalen und dorso – ventralen Achse des Nucleus ausgewählt.

Dazu wurden mit Hilfe des Zeichentubus maßstabsgetreue Umrisszeichnungen der Somata und Dendriten sowie des Maßstabs (in 10  $\mu\text{m}$  Abschnitten auf Transparentpapier) angefertigt. Zur Zählung der gefärbten Punkta wurde der gezeichnete Maßstab auf die Zeichnung der Zelle gelegt und über die Zeichenhilfe in die Focusebene projiziert. Um den Somaumfang zu bestimmen wurden die Zeichnungen mit einem Flachbettscanner (HP ScanJet 5370C) an einem Computer digitalisiert und im TIFF-Bildformat abgespeichert, im Anschluss konnte der exakte Umfang (in  $\mu\text{m}$ ) mittels einer geeichten Bildanalysesoftware (DigiTrace, Imatec, Miesbach, Deutschland) ermittelt werden.

Aus diesen Daten konnte dann das Verhältnis von Punkta / Somamembranumfang und Punkta / Membranlänge / Dendritenabschnitt als Punktdichte / Soma bzw. Punktdichte / Dendritenabschnitt für jede Zelle berechnet werden (Microsoft Excel 2000). Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu erhalten wurden diese bezogen auf die jeweilige Punktdichte am Soma normalisiert. Die normalisierten Daten wurden für jede experimentelle Gruppe gemittelt.

### 3.1.4.2 Quantifizierung der Verteilung von Glycinrezeptorclustern an einzelnen MSO-Neuronen

Zur Bestimmung der Verteilung von markierten, postsynaptischen Glycinrezeptorclustern auf einzelnen Neuronen wurden die Dendriten der Zellen in 26 µm breite Abschnitte gegliedert, wobei der erste dendritische Zählabschnitt unmittelbar am Ende des Somas der Zelle begann. Im Gegensatz zu der in Kapitel 3.1.4.1 dargestellten Analyse der Verteilung von Glycin und Gephyrin wurde bei dieser Analyse nur die Verteilung von Glycinrezeptoren auf den Dendriten bestimmt, die Verteilung am Soma der Zellen konnte auf Grund der massiven Färbung nicht bestimmt werden. Bedingt durch die sehr hohe Färbungsdichte und Intensität an der Membran sowie in intrazellulären Kompartimenten war sowohl die optische Trennung einzelner membrangebundener Rezeptorcluster (Definition siehe unten), als auch die Unterscheidung von membrangebundenen und damit postsynaptisch vorliegenden Rezeptorclustern und intrazellulär vorliegenden Rezeptorbestandteilen nicht mit ausreichend hoher Sicherheit möglich. An individuellen Neuronen wurde daher die Dichte von markierten, postsynaptischen Glycinrezeptorclustern in 26 µm breiten Dendritenabschnitten, ausgehend vom Soma, von proximal nach distal bestimmt. Die präsentierten Daten setzen sich wie in Tabelle 8 dargestellt zusammen.

**Tabelle 8:** Einteilung und Herkunft der Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung von markierten Glycinrezeptorclustern an den Dendriten einzelner MSO-Zellen

Experimentelle Gruppe	Adult	UCA
Anzahl Tiere	3	3
Anzahl MSO-Dendriten	41	41
Anzahl untersuchter Gehirnschnitte	13	12
Anzahl untersuchter optischer Schnitte	120	81

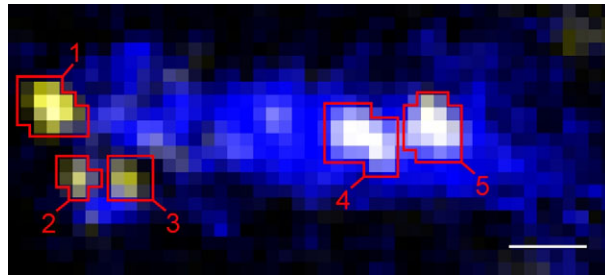
Die gezeigten Daten stammen von insgesamt sechs Wüstenrennmäusen aus zwei experimentellen Gruppen. Die Zahl der Dendriten entspricht der Zahl der untersuchten Zellen, pro Zelle wurde nur ein Dendrit ausgewertet. Die untersuchten Zellen wurden statistisch entlang der rostro – caudalen und dorso – ventralen Achse des Nucleus ausgewählt.

MSO-Zellen in doppelgefärbten Schnitten (Glycinrezeptor und MAP2) wurden am konfokalen Mikroskop mit maximaler Vergrößerung (63-faches Objektiv, ohne Zoom) so aufgenommen, dass sowohl die Zellkörper, als auch jeweils ein gesamter, markierter Dendrit der bipolaren Zellen erkennbar war. Die einzelnen optischen Schnittebenen beider Serien (je 2 – 12 Schnittebenen) wurden addiert (s.h. Kapitel 3.1.3.1), so dass eine Zelle mit ihren gesamten Dendriten wieder vollständig in einem digitalen Bild zusammengefasst

war. Über das addierte Bild wurde in einer Grafiksoftware (Macromedia FreeHand 8.0.1b, Macromedia, San Francisco, CA, USA) ein Zählraster mit 26 µm Gitterabstand gelegt, wobei Bild und Raster so orientiert wurden, dass der Dendrit und die Gitterlinien orthogonal zueinander standen. Um den auszuwertenden Dendriten besser hervorzuheben und von anderen Dendritenstücken zu trennen, wurde der Umriss des Dendriten mit einer dünnen Linie auf einer weiteren Zeichenebene der Grafiksoftware nachgezeichnet. Zur eigentlichen Auswertung der gefärbten Glycinrezeptorcluster pro Abschnitt wurde danach das Gesamtbild der Zelle durch die addierten Bilder der einzelnen optischen Schnittebenen ersetzt, d.h. nur die beiden in der z-Ebene korrespondierenden optischen Schnitte der Glycinrezeptor- und MAP2-Färbung wurden addiert und analysiert. Dieses Vorgehen ermöglichte ein Maximum an räumlicher Auflösung und damit eine bessere Trennung von einzelnen Glycinrezeptorclustern entlang der x-, y- und z-Achse, da sich nun die Pixelintensitäten mehrerer Ebenen nicht mehr überlagerten. Durch die Grafiksoftware wurden diese Einzelbilder nacheinander an die vorher eingestellte Position des Gesamtbildes plaziert, dann wurde die Anzahl der Cluster pro 26 µm Dendritenabschnitt von Hand ausgezählt.

Als einzelnes Glycinrezeptorcluster wurde ein 3 x 3 – 6 x 6 Pixel großes zusammenhängendes Objekt gelber oder weißer Pixel definiert. Während der Bearbeitung der Bilder wurde positive Färbung für Glycinrezeptoren nach Definition (s.h. Tab. 6) gelb, positive Färbung für MAP2 blau dargestellt. Wenn nun die einzelnen optischen Schnitte der beiden Färbungen addiert wurden, hatte dies zur Folge, dass in doppelgefärbten Bereichen mit einer gleich hohen Intensität der gelben und blauen Pixel eine Mischfarbe, in diesem Fall weiß, entstand. Daher zeigten sowohl gelbe als auch weiße Pixel positiv markierte Glycinrezeptorcluster an (Abb. 5). Um nun die Cluster eindeutig zu identifizieren und voneinander zu trennen wurde zunächst eine ausreichend hohe Vergrößerung der Grafiksoftware gewählt, um eine Ansicht auf der Ebene einzelner Pixel zu gewährleisten. Bei dieser Ansicht bestand ein typisches Cluster aus einem oder mehreren zentralen Pixeln mit sehr hoher Intensität (nahe dem Farbsättigungswert von 255), sowie meist einer oder zwei Reihen von kreis- oder sternförmig um das Zentrum angeordneten Pixeln mit deutlich niedrigerer Farbintensität (Abb. 5). Die Form der Cluster war dabei variabel. Kleine Cluster zeigten meist eine quadratische Grundform, bei größeren kamen neben regelmäßig rechteckigen auch eher unregelmäßige, aus mehreren Rechtecken und Quadraten zusammengesetzte Formen vor (Abb. 5).





**Abbildung 5:** Identifizierung einzelner Glycinrezeptorcluster zur quantitativen Analyse

Zur Analyse der Verteilung von markierten Glycinrezeptoren auf Dendriten individueller MSO-Neurone wurden zwei korrespondierende konfokal-optische z-Ebenenschnitte eines gegen Glycinrezeptor / MAP2 doppelgefärbten Gehirnschnitts addiert. Per Definition wurde positive Färbung für Glycinrezeptoren dabei gelb dargestellt, positive Färbung für MAP2 in blau. Durch die Addition der Farbwerte in doppelgefärbten Pixeln ergaben sich je nach Intensität der gelben und blauen Pixel verschiedene Mischfarben. Positiv markierte Glycinrezeptorcluster erscheinen daher in einem Spektrum von Farbwerten zwischen dunklem gelb – braun und weiß.

Der auf Pixelansicht vergrößerte Ausschnitt einer so zusammengesetzten Aufnahme zeigt ein Dendritenstück (blau, MAP2) mit mehreren identifizierten Glycinrezeptorclustern (1 – 5, gelb / weiß, durch rote Linien hervorgehoben). Die Cluster bestehen aus einem (2, 3) oder mehreren (1, 4, 5) zentralen Pixeln hoher Farbintensität und kreis- oder sternförmig um das Zentrum angeordneten Pixeln niedrigerer Intensität. Im ganzen schließen die Cluster ein 3 x 3 – 6 x 6 gelb – braune (1 – 3) oder weiße (4, 5) Pixel umfassendes Objekt variabler Form ein. Basierend auf dieser Clusterdefinition (s.h. auch Text) konnten positiv markierte Glycinrezeptorcluster mit hoher Sicherheit abgegrenzt werden.

Maßstab: 1 µm

Der Farbgradient, sowie die empirisch ermittelten typischen Clustergrößen und Formen (s.h. oben) ermöglichte es zudem auch größere Clusterfelder, die sich aus mehreren Einzelclustern zusammensetzten, wieder in diese aufzutrennen. Um Doppelzählungen auszuschließen, wurde jedes identifizierte Cluster auf einer weiteren Zeichenebene mit einem Punkt markiert.

Für jeden einzelnen Dendriten wurde die Anzahl der Cluster pro Zählabschnitt über alle analysierten optischen Schnitte summiert und danach bezogen auf den Wert des ersten, unmittelbar ans Soma angrenzenden, Dendritenabschnitts normalisiert. Die normalisierten Werte wurden für jede experimentelle Gruppe zusammengefasst und pro Dendritenabschnitt gemittelt.

### 3.1.4.3 Quantifizierung der Verteilung Gephyrin-positiver Punkte im Gesamtkernbereich der MSO

Unabhängig von der Verteilung auf einzelnen Neuronen (s.h. Kapitel 3.1.4.1) wurde bei dieser Analyse die Verteilung markierter Gephyrincluster über das gesamte Kerngebiet der MSO bestimmt. Durch diese Methode konnte ein Verteilungsprofil glycinerner Synapsen von der lateralen zur medialen Grenze des Nucleus, unter Einbeziehung möglichst vieler

Neurone, erstellt werden. Die präsentierten Daten setzen sich wie in Tabelle 9 dargestellt zusammen.

**Tabelle 9:** Einteilung und Herkunft der Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung von markierten Gephyrinclustern im Gesamtkernbereich der MSO

Experimentelle Gruppe	Adult	Jung	UCA
Anzahl Tiere	3	3	2
Anzahl MSO-Nuclei	6	6	4
Anzahl untersuchter Gehirnschnitte	9	9	7

Die ausgewerteten Daten stammen von insgesamt acht Wüstenrennmäusen, verteilt auf drei experimentelle Gruppen. Die untersuchten Schnitte wurden statistisch aus verschiedenen Ebenen entlang der rostro – caudalen Achse der MSO ausgewählt. Die ausgewerteten Kernbereichausschnitte wurden statistisch entlang der dorso – ventralen Achse gewählt.

Von einer Ebene des Nucleus wurden im Mikroskop bei maximaler Vergrößerung (620-fache Vergrößerung) hochformatige Diabilder entlang einer gedachten, orthogonal zur dorso – ventralen Achse des Somabandes der MSO stehenden Linie aufgenommen. Die Achse verlief bezogen auf die Mittellinie des Hirnstamms von medial nach lateral. Die Abfolge der Aufnahmen wurde so gewählt, dass möglichst keine Überlappungen zwischen vorhergehendem und nachfolgendem Bild entstanden. Um die Aufnahmeachse korrekt zu justieren wurde die Aufnahmeserie einer MSO-Ebene immer in der Mitte des Somabandes begonnen und dann nach medial und lateral bis zur Grenze des Nucleus fortgesetzt. Charakteristische Merkmale der jeweiligen Schnittebene wie auffällige Zellen, kleine Löcher oder Blutgefäße dienten dabei der Orientierung. Pro Ebene wurden je eine zentrale (Soma) Aufnahme und bis zu drei Aufnahmen in medialer bzw. lateraler Richtung aufgenommen. Alle Aufnahmen stammten dabei aus derselben Fokusebene.

Zur Auswertung wurden die Aufnahmen mit einem Diaprojektor auf eine abwischbare Magnettafel projiziert. Beim allerersten analysierten Bild wurde der Rand der projizierten Aufnahme mit einem Tafelmarker markiert, dieser Rahmen wurde vermessen (Höhe: 86,5 cm; Breite: 57,0 cm) und als Standardrahmen für alle folgenden Diabilder verwendet. Die Projektionen aller folgenden Diabilder wurden so ausgerichtet, dass sie sich in diesen Rahmen einfügten. Um eine feinere Auflösung der Synapsenverteilung zu erhalten wurde der Rahmen in drei gleich große vertikale Zählsektoren (je 19 cm) unterteilt. Mit Hilfe eines in diesen Rahmen projizierten Maßstabsdias konnte die relative Größe des Rahmens und der Zählabschnitte in Bezug auf die untersuchten Nuclei berechnet werden. Die Größe eines Zählabschnitts entsprach dabei einem Rechteck von 120 µm (h) x 26 µm (b) auf dem Hirnschnitt. Die Nummerierung der einzelnen Abschnitte

erfolgte ausgehend vom mittleren Abschnitt des Zentralsdias jeweils in mediale und laterale Richtung. Die Zählung der Cluster erfolgte direkt am projizierten Bild, wobei durch die vergrößerte Projektion auch sehr kleine Cluster gut aufgetrennt werden konnten, was eine genaue Auswertung der Unterschiede ermöglichte. Um Doppelzählungen auszuschließen wurden gezählte Cluster mit einem Punkt markiert.

Um ein Dichteverhältnis von Gephyrinclustern pro 26 µm Zählabschnitt zu erhalten, wurden die Absolutwerte für jede analysierte MSO-Ebene (entspricht einem Gehirnschnitt) auf den Wert des Zentral-(Soma)-Abschnitts normalisiert. Diese Werte wurden für jede experimentelle Gruppe zusammengefasst und pro Abschnitt gemittelt.

#### 3.1.4.4 Quantifizierung der Verteilung Glycin-positiver Punkte im Gesamtkernbereich der MSO

Zusätzlich zu der in Kapitel 3.1.4.1 dargestellten Analyse der Verteilung glycinerner Boutons auf einzelnen Neuronen wurde deren Verteilung auch im Gesamtkernbereich des Nucleus bestimmt. Dazu wurde eine Bildanalysesoftware (DigiTrace, Imatec, Miesbach, Deutschland) und eine Computer-basierte Auswertroutine verwendet. Hintergrund dieser Analyse war in erster Linie, die Ergebnisse aus der Einzelzellanalyse an doppel-immunfluoreszent gefärbten Gehirnschnitten unter Verwendung eines anderen Analyseverfahrens zu überprüfen und zu bestätigen. Aus diesem Grund wurde nur eine experimentelle Gruppe (Adult) ausgewertet. Die präsentierten Daten setzen sich wie in Tabelle 10 dargestellt zusammen.

**Tabelle 10:** Einteilung und Herkunft der Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung von markierten glycinergen Boutons im Gesamtkernbereich der MSO bei adulten Wüstenrennmäusen

Experimentelle Gruppe	Adult
Anzahl Tiere	2
Anzahl MSO-Nuclei	4
Anzahl untersuchter Gehirnschnitte	10
Anzahl untersuchter optischer Schnitte	91

Die analysierten Daten stammen von 2 adulten Wüstenrennmäusen. Die untersuchten Gehirnschnitte wurden statistisch aus verschiedenen Ebenen entlang der rostro – caudalen Achse der MSO ausgewählt. Die ausgewerteten optischen Schnitte stammen aus konfokalen Aufnahmen, die statistisch entlang der dorso – ventralen Achse der MSO ausgewählt wurden.

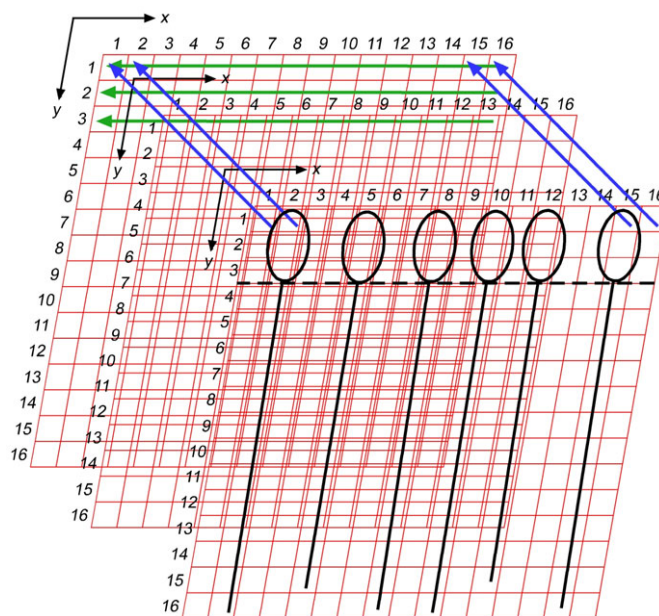
Doppelgefärbte Gehirnschnitte (Glycin und MAP2) wurden am konfokalen Mikroskop mit maximaler Vergrößerung (63-faches Objektiv ohne Zoom) so aufgenommen, dass sowohl

die Zellkörper, als auch der mediale oder laterale Dendritenraum zu einem möglichst großen Teil erkennbar war. Es wurde dabei darauf geachtet den Rand der Aufnahme möglichst parallel zur dorso – ventralen Achse der MSO-Zellkörper auszurichten. Die parallele, randständige Lage der Zellkörper ermöglichte es später in der Analyse die Grenze zwischen Somabereich und den Dendritenabschnitten exakter festzulegen. Die einzelnen optischen Schnittebenen der beiden Serien wurden getrennt gespeichert. Die Analyse der Verteilung glycinерger Boutons im gesamten Nucleus wurde anschließend nur an den Bildserien der Glycin – Immunfluoreszenz durchgeführt. Bei allen optischen Schnitten wurde vor der Analyse der Kontrast der Graustufen-Pixelwerte in gleichem Maße angepasst (s.h. Kapitel 3.1.3.1). Eine Überführung der Graustufenwerte in den Falschfarbencode, sowie die Rotation der Schnitte um 90° fand nicht statt.

Zur eigentlichen Zählung der Boutons wurden die einzelnen optischen Schnitte sequenziell durch ein speziell für diese Analyse geschriebenes Makro (programmiert von Gerhard Breutel, Max-Planck-Institut für Neurobiologie) in die Bildanalysesoftware (DigiTrace) eingeladen und automatisch weiterprozessiert. Das Makro enthielt mehrere Verarbeitungsroutinen, die u.a. die Graustufenbilder in Binärbilder umwandelten, sowie durch weitere Verarbeitungsschritte die Boutons als Objekte charakterisierten. Durch Einstellen der empirisch ermittelten Minimal- und Maximalgröße der Boutons in Pixel, sowie von bestimmten, ebenso empirisch ermittelten Formfaktoren (analog zur Bestimmung der Glycinrezeptorcluster in Kapitel 3.1.4.2) war es möglich, mit einer sehr hohen Zuverlässigkeit Boutons zu detektieren und zusammenhängende Boutons wieder in einzelne Objekte aufzutrennen. Nach diesen Schritten der Bildbearbeitung startete der automatische Zählalgorithmus. Um eine möglichst feine räumliche Auflösung der Verteilung zu erhalten wurde ein sich verschiebendes Zählquadrat mit 64 Pixeln Kantenlänge (entspricht 9,92 µm auf dem Gehirnschnitt) definiert, das den gesamten optischen Schnitt in einer x-y Matrix abtastete. Wie Abb. 2 zeigt, bestand ein optischer Schnitt (1024 x 1024 Pixel) aus 16 x 16 Zählquadraten. Jeder Position eines Quadrats war somit eine definierte x-y Koordinate zugeordnet. Wie weiter aus der Abbildung hervorgeht, entsprach die x-Achse der Matrix der dorso – ventralen, die y-Achse der medio – lateralen Achse der MSO.

Das Programm zählte nun, basierend auf den vorgegebenen Kriterien, die Anzahl der Objekte pro Quadrat. Wenn die Pixel eines Objekts den rechten oder den unteren Rand des Quadrats berührten bzw. schnitten, so wurden diese Objekte nicht für dieses Quadrat gewertet. Dagegen wurden Objekte, welche den linken oder oberen Rand des Quadrats berührten diesem zugeschlagen. Auf diese Weise konnten Doppelzählungen von Objekten

in der x-y Ebene verhindert werden. Doppelzählungen in der z-Ebene konnten im Vorfeld durch den manuellen Vergleich von mehreren optischen z-Ebenenschnitten ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle der Selektivität des Makros wurden stichprobenartig Bildserien sowohl automatisch als auch manuell ausgewertet, dabei zeigte sich eine Übereinstimmung in den Ergebnissen beider Methoden im Bereich zwischen 95 und 99%. Die Ergebnisse der automatischen Analyse wurden durch die Software für jeden optischen z-Ebenenschnitt in der Form x-Koordinate / y-Koordinate und Zählergebnis abgelegt. Die Zählwerte pro Kästchen aller einzelnen optischen Schnitte eines tatsächlichen Gehirnschnitts (eine Schnittserie) wurden danach in einer gesamt x-y Matrix zusammengefasst. Dabei wurden die Werte einer bestimmten Koordinate über alle z-Ebenen summiert (Abb. 6, blaue Pfeile). Um ein Verteilungsprofil der Boutons entlang der y-Koordinate (medio – lateral im Nucleus) zu erhalten, wurde im Anschluss über alle x-Werte einer bestimmten y-Koordinate summiert (Abb. 6, grüne Pfeile).



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der automatisierten Quantifizierung von Glycin im Gesamtkernbereich der MSO

Die einzelnen optischen Schnitte einer Serie (rote Quadrate) wurden durch den Zählalgorithmus in eine 16 x 16 Kästchen umfassende Matrix unterteilt (Kantenlänge pro Kästchen 9,92 µm bzw. 64 Pixel). Wie an der Lage der schematisch eingezeichneten Zellen (schwarz, in vorderster Ebene) zu erkennen, entspricht die x-Achse der Matrix der dorso – ventralen, die y-Achse der medio – lateralen Achse der MSO. Jedem Kästchen war damit eine spezifische Koordinate zugeordnet. Das Programm zählte die Anzahl der Objekte pro Kästchen, im Anschluss wurden die Zählwerte jedes Kästchens über alle z-Ebenen einer Serie summiert (blaue Pfeile). Um ein medio – laterales Verteilungsprofil der glycinergen Boutons zu erhalten, wurden danach die summierten Kästchenwerte entlang ihrer y-Koordinate zusammengefasst (grüne Pfeile). Die Grenze zwischen Somabereich und Dendritenfeld (gestrichelte Linie) wurde manuell entlang einer y-Koordinate (Kästchenunterkante) mittels der MIP der doppelgefärbten Serie (Glycin / MAP2) bestimmt.

Um die Grenze zwischen dem Bereich der Zellkörper und der Dendriten festzulegen, wurden alle analysierten z-Ebenenschnitte eines tatsächlichen Gehirnschnitts, sowie die korrespondierenden Ebenen der MAP2-Serie wieder zu einem Gesamtbild addiert (s.h. Kapitel 3.1.3.1) und in einem Graphikprogramm (FreeHand) unter die Zeichnung der Zählmatrix gelegt. Die Grenze wurde dann manuell entlang einer y-Koordinate (untere Kante der Kästchen) gezogen (Abb. 6, gestrichelte schwarze Linie). Durch die Gegenfärbung mit MAP2 und die ausgeprägte Färbung für Glycin an den Zellkörpern konnte diese Grenze mit hoher Zuverlässigkeit gezogen werden. Die Zählungen der Soma-kästchen wurden danach zu einer Gesamt-Somasumme zusammengefasst. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten dieser Analyse mit den Daten der Handauszählung auf einzelnen Neuronen (s.h. Kapitel 3.1.4.1) zu erhalten wurden jeweils zwei Dendritenzählkästchen a 9,92  $\mu\text{m}$  (gerundet auf 10  $\mu\text{m}$ ) zusammengefasst. Die Dichte an Boutons pro 20  $\mu\text{m}$  Dendritenabschnitt wurde anschließend, bezogen auf den Wert im Somaabschnitt, normalisiert und über alle Gehirnschnitte gemittelt.

#### 3.1.4.5 Quantifizierung der Verteilung von Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO

Zur Bestimmung der Verteilung von markierten Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO wurde eine modifizierte Version der in Kapitel 3.1.4.4 dargestellten automatisierten Methode verwendet. Bei der vorliegenden Analyse wurde die Clusterzahl durch den Zählalgorithmus nicht an einem gesamten optischen Schnitt bestimmt, sondern es wurden mehrere definierte Ausschnitte des optischen Schnitts analysiert. Wie bei der Auswertung der Verteilung von Glycinrezeptorclustern auf einzelnen Neuronen (s.h. Kapitel 3.1.4.2) wurde bei dieser Analyse die Verteilung der Cluster nur im Dendritenfeld bestimmt. Wie bereits dort dargestellt, war bedingt durch eine sehr hohe Färbungsdichte und Intensität am gesamten Zellkörper die optische Trennung einzelner membrangebundener Rezeptorcluster, sowie die Unterscheidung zwischen postsynaptisch und intrazellulär vorliegenden Rezeptorclustern nicht mit ausreichend hoher Sicherheit möglich. Die präsentierten Daten setzen sich wie in Tabelle 11 dargestellt zusammen.

Analog zu der in Kapitel 3.1.4.4 beschriebenen Analyse wurden doppelgefärbte Gehirnschnitte (Glycinrezeptor und MAP2) am konfokalen Mikroskop mit maximaler Vergrößerung (63-faches Objektiv ohne Zoom) so aufgenommen, dass sowohl die Zellkörper, als auch der mediale oder laterale Dendritenraum zu einem möglichst großen Teil erkennbar war. Die Ausrichtung der Zellkörper entlang der dorso – ventralen Achse

erfolgte in derselben Weise wie in Kapitel 3.1.4.4 dargestellt. Die Analyse der Verteilung von Glycinrezeptorclustern wurde anschließend nur an den Bildserien der Glycinrezeptor – Immunfluoreszenz durchgeführt. Bei allen optischen Schnitten wurde vor der Analyse der Kontrast der Graustufen-Pixelwerte in gleichem Maße angepasst (s.h. Kapitel 3.1.3.1).

**Tabelle 11:** Einteilung und Herkunft der Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung von markierten Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO

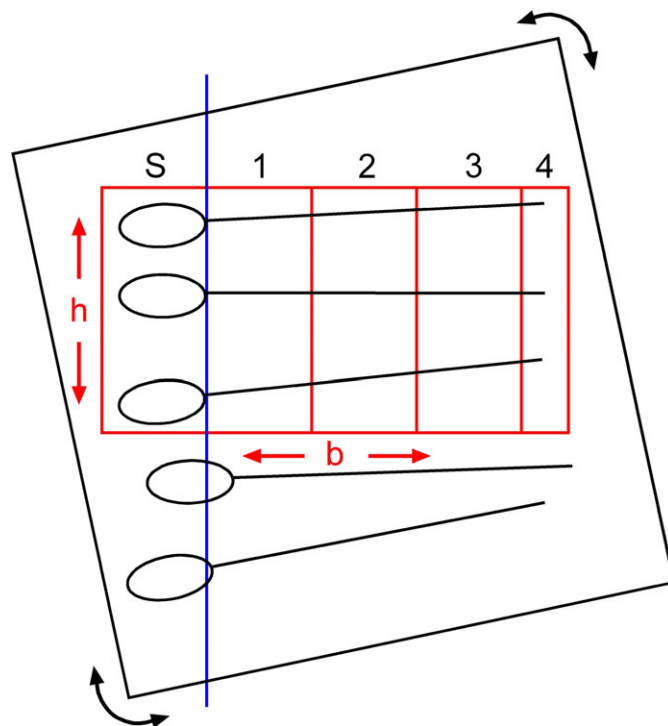
Experimentelle Gruppe	Adult	UCA
Anzahl Tiere	4	3
Anzahl MSO-Nuclei	8	6
Anzahl untersuchter Gehirnschnitte	15	15
Anzahl untersuchter optischer Schnittserien	23	42
Anzahl untersuchter optischer Schnitte	63	108
Anzahl untersuchter Ausschnitte	58	124

Die analysierten Daten stammen von insgesamt 7 Wüstenrennmäusen aus zwei experimentellen Gruppen. Die Anzahl der Gehirnschnitte gibt an, wieviele tatsächliche (physische) Schnitte pro Gruppe untersucht wurden. Die Anzahl der optischen Schnittserien gibt an, wieviele konfokale Aufnahmen der tatsächlichen Schnitte in die Analyse eingingen. Die Anzahl der optischen Schnitte zeigt wieviele einzelne z-Ebenenschnitte untersucht wurden, wogegen die Anzahl der untersuchten Ausschnitte angibt, wieviele einzelne x-y Kernbereichsausschnitte in den optischen Schnitten ausgewertet wurden. Die untersuchten Gehirnschnitte wurden statistisch aus verschiedenen Ebenen entlang der rostro – caudal Achse der MSO ausgewählt. Die Kernbereichsausschnitte wurden statistisch entlang der dorso – ventralen Achse gewählt.

Die Auswahl der Bildausschnitte in denen letztendlich die Verteilung der Glycinrezeptorcluster bestimmt wurde, fand an Hand der kombinierten Glycinrezeptor- und MAP2-MIPs einer Schnittserie in einem Bildbearbeitungsprogramm (Adobe Photoshop) statt. Die MIPs wurden zunächst um 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht, um die dorso – ventrale Achse der MSO und damit den Zellkörperstreifen wieder im Bild von oben nach unten auszurichten. Soweit notwendig, wurden die Bilder danach in der Horizontalen gespiegelt um bei allen Bildern die gleiche Lage der Zellkörper, am linken Rand des Bildes zu erhalten. Da es für diese Analyse essentiell war, eine exakte Abgrenzung der Zellkörper von den Dendriten zu erhalten, war es notwendig die Bilder und die Zählfenster (Abb. 7) vorher aufeinander abzustimmen. Das war im Besonderen deshalb notwendig, da die Lage des Zellkörperstreifens in der MSO und die Lage der Zellkörper im Streifen zu einem gewissen Grad variabel sein konnte. Zudem lag die Aufnahmeachse der Bilder nicht immer optimal entlang der dorso – ventralen Achse des Nucleus, was zu einem eher schrägen Verlauf des Zellkörperstreifens im Bild führte. Um diese Ungenauigkeiten auszugleichen und eine exakte Auswertung zu ermöglichen, wurde



der Zellkörperstreifen deshalb auf den Bildern in kleinere Zellgruppen (Zählausschnitte) unterteilt. Um die Zellgruppen optimal in ein Zählfenster zu plazieren wurden die Bilder so lange gedreht, bis der Beginn der proximalen Dendriten auf einer vertikalen Linie (Abb. 7, blaue Linie) und der Verlauf der gesamten Dendriten in etwa parallel zur horizontalen Kante des Zählfensters lag (Abb. 7, roter Ausschnitt). Die Höhe eines Zählfensters ergab sich aus der Höhe des gewählten Ausschnitts. Per Definition wurde festgelegt, dass Summe der Höhen aller Ausschnitte einer Serie mindestens 40  $\mu\text{m}$  (256 Pixel) betragen soll. Dies stellte sicher, dass das Gewicht der Schnittserien in der Gesamtpopulation in etwa gleich groß war.



**Abbildung 7:** Schema der Auswahl von Zählfenstern zur Quantifizierung von Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO

Zur Auswahl der später analysierten Zählfenster (rot) wurde die MIP einer doppelgefärbten Serie (Glycinrezeptor / MAP2) so lange gedreht (schwarze Pfeile), bis der Übergang von Soma zu proximalem Dendriten bei mehreren Zellen (schematisch, schwarz) auf einer vertikalen Linie (blau) lag. Die Höhe (h) eines individuellen Zählfensters ergab sich aus der Anzahl der Zellen die obiges Kriterium erfüllten, insgesamt musste die Höhensumme aller gewählten Fenster einer Serie mindestens 40  $\mu\text{m}$  (256 Pixel) betragen. Die Gesamtbreite (b) des Zählfensters war variabel und ergab sich aus der Ausdehnung der Dendriten. Zur Analyse wurde die Gesamtbreite der Fenster später durch den Zählalgorithmus in 20  $\mu\text{m}$  (128 Pixel) breite Zählabschnitte unterteilt. Das Zählfenster wurde deshalb so angepasst, dass der erste Abschnitt immer exakt den Somabereich einschloss und an der Grenze zum proximalen Dendriten endete (S). Die folgenden Abschnitte (1 – 4) stellen die Dendritenabschnitte dar und gingen in die Analyse ein, soweit der Abschnitt die volle Breite von 20  $\mu\text{m}$  zeigte. Im dargestellten Schema würde daher Abschnitt 4 nicht in die Analyse eingehen. Nachdem die Koordinaten der Zählfenster festgelegt waren, wurde die MIP durch die einzelnen optischen Schnitte der Glycinrezeptorserie ersetzt. Aus jedem zweiten optischen Schnitt der z-Serie wurden danach die Zählfenster ausgeschnitten und dem Zählalgorithmus zugeführt.



In der Breite wurde das Zählfenster in mehrere 128 Pixel (20  $\mu\text{m}$ ) breite Abschnitte gegliedert. Der erste Zählabschnitt lag per Definition immer im Somabereich, mit seiner Grenze genau am Beginn des proximalen Dendritens (rechts von der blauen Linie in Abb. 7). Die Gesamtbreite des Ausschnitts und damit die Anzahl der Abschnitte des Zählfensters ergab sich aus der Ausdehnung der Dendriten. Der Ausschnitt wurde so gewählt, dass alle sichtbaren Dendriten dieses Bereichs enthalten waren. Die Koordinaten dieses Zählabschnitts wurden notiert, danach wurde die MIP durch die einzelnen optischen Schnitte der Serie ersetzt. Von jedem zweiten Schnitt der Serie wurde der vorher definierte Bereich als TIFF-Bild ausgeschnitten und gespeichert. Diese Einzelausschnitte einer Serie gingen danach in die automatische Analyse ein.

Zur Quantifizierung der Glycinrezeptorcluster wurden die Ausschnitte der einzelnen optischen Schnitte einer Serie sequenziell durch eine speziell für diese Analyse angepasste Version des Makros aus Kapitel 3.1.4.4 (programmiert von Gerhard Breutel, Max-Planck-Institut für Neurobiologie) in die Bildanalysesoftware (DigiTrace) eingeladen und automatisch weiterverarbeitet. Die generelle Verarbeitungsroutine des Makros folgte den in Kapitel 3.1.4.4 dargestellten Schritten. Durch Einstellen der empirisch ermittelten Minimal- und Maximalgrößen der Cluster (in Pixel), sowie der ebenso empirisch ermittelten Formfaktoren (basierend auf den in Kapitel 3.1.4.2 festgelegten Kriterien) war es mit einer sehr hohen Zuverlässigkeit möglich, die Cluster zu detektieren und zusammenhängende Cluster bis zu einem gewissen Grad wieder in einzelne Objekte aufzutrennen. Wie bereits bei der Analyse der Glycinrezeptorcluster auf einzelnen Neuronen dargestellt (s.h. Kapitel 3.1.4.2), war es aufgrund der massiven Färbungsdichte und Intensität an der Membran sowie in intrazellulären Kompartimenten nicht möglich einzelne membrangebundene Rezeptorcluster am Soma mit hoher Zuverlässigkeit optisch zu trennen. In die Analyse gingen daher nur die Zählungen der Cluster auf den Dendriten ein. Der Zählalgorithmus bestimmte die Verteilung der Objekte, indem ein Zählrechteck von 128 Pixeln (20  $\mu\text{m}$ ) Breite (x-Achse) und variabler Höhe (y-Achse, so hoch wie der Ausschnitt) entlang der Dendriten von proximal nach distal wanderte. Das Programm zählte nun, basierend auf den vorgegebenen Kriterien, die Anzahl der Objekte pro Zählrechteck. Wenn die Pixel eines Objekts den rechten Rand des Rechtecks berührten bzw. schnitten, so wurden diese Objekte nicht zu diesem Rechteck gezählt. Auf diese Weise konnten Doppelzählungen von Objekten entlang der x-Achse verhindert werden. Wenn der letzte Abschnitt des auszuwertenden Ausschnitts nicht die vollen 128 Pixel des Zählrechtecks breit war, so wurde dies vom Makro erkannt und der Abschnitt nicht gewertet. Doppelzählungen in der z-Ebene konnten bei dieser Auswertung durch die

Analyse jedes zweiten z-Ebenenschnittes ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle der Selektivität des Makros wurden, analog zu der in Kapitel 3.1.4.4 dargestellten Analyse, stichprobenartig Bildserien sowohl automatisch als auch manuell ausgewertet. Dabei stimmten die Ergebnisse beider Methoden zu 98 – 100% überein.

Die Ergebnisse der automatischen Analyse wurden durch die Software für jeden optischen z-Ebenenausschnitt in der Form x-Koordinate / y-Koordinate (hier immer 1) und Zählergebnis abgelegt. Die Zählwerte pro Abschnitt aller z-Ebenenausschnitte einer optischen Schnittserie wurden danach in einer x-y Matrix zusammengefasst. Dabei wurden die Werte für einen bestimmten x-Abschnitt zuerst über alle Ebenen einer Serie aufsummiert und danach gemittelt. Die gemittelten Werte der Verteilung wurden dann bezogen auf den Wert des ersten (proximalen) Dendritenabschnitts normalisiert. Die normalisierten Werte aller Schnittserien eines tatsächlichen Gehirnschnitts wurden danach gemittelt. Für jeden tatsächlichen Gehirnschnitt ergab sich daher ein Mittelwert der Verteilung über die Zählabschnitte der dann in die statistische Analyse einging.

#### 3.1.4.6 Statistische Analyse und graphische Darstellung der Quantifizierungen

Die statistischen Auswertungen der Verteilung von Glycin, Gephyrin und Glycinrezeptoren in den verschiedenen experimentellen Gruppen wurden mit einer Statistiksoftware (Statistica 5.1, StatSoft, Tulsa, OK, USA) durchgeführt. Die Untersuchungen wurden jeweils an den normalisierten Daten aus den verschiedenen Quantifizierungen durchgeführt, dabei wurden die Ergebnisse für die Verteilungen in den verschiedenen experimentellen Gruppen jeweils getrennt für jede Färbung und Methode der Quantifizierung bestimmt. Bei der Gruppe der einseitig vertäubten Tiere (UCA) wurde nicht zwischen ipsi- und contralateral zur vertäubten Cochlea liegenden MSO-Nuclei / Neuronen unterschieden (s.h. auch Ergebnisse in Kapitel 4.1.4). Signifikante Unterschiede in der Verteilung glycinерger Synapsen zwischen den experimentellen Gruppen wurden unter Verwendung eines nicht-parametrischen Tests ermittelt. Parametrische Tests konnten für diese Analyse nicht verwendet werden, da die Daten in den verschiedenen Gruppen nicht normalverteilt vorlagen. Der verwendete Test war der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben (MWU-Test), dabei wurden Ergebnisse ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) als signifikant erachtet. Die Abbildungen der Verteilungen in den verschiedenen experimentellen Gruppen (Abb. 18, 28) wurden ebenfalls in Statistica erstellt und stellen die Verteilung der Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dar.

### **3.2 Methoden der *in vitro* Elektrophysiologie**

Die präsentierten Ergebnisse der *in vitro* elektrophysiologischen Experimente stammen von insgesamt 36 MSO-Neuronen aus 16 mongolischen Wüstenrennmäusen verschiedener Altersstufen. Das genaue Geburtsdatum neugeborener Jungtiere wurde durch tägliche Kontrolle der Brutkolonie ermittelt. Der Tag des ersten Auffindens von Neugeborenen wurde als Postnataltag 0 (P0) definiert. Gemäss ihres Alters wurden die Tiere in experimentelle Gruppen eingeteilt (Tab. 12).

**Tabelle 12:** Zusammenfassung der Versuchstiere und der analysierten Zellen bei den *in vitro* Experimenten

Experimentelle Gruppe <i>in vitro</i>	P12	P14	P15	P16	P17
Anzahl Tiere	1	6	2	1	6
Gesamtzahl MSO-Neurone	3	15	3	2	13
Anzahl MSO-Neurone CC	3	4	3	2	5
Anzahl MSO-Neurone VC	—	12	1	1	10

Die abgeleitenden Neurone verteilen sich auf verschiedene Altersstufen nach Hörbeginn an Postnataltag (P) 12, mit einem Schwerpunkt an P14 und P17. Bei P14, P15, und P16 wurden an je einer Zelle, bei P17 an zwei Zellen, die Experimente sowohl im „current-clamp“ (CC) als auch im „voltage-clamp“ (VC) Modus des Verstärkers durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Physiologie der inhibitorischen Synapsen an MSO-Neuronen wurden mit Methoden der intrazellulären Ableitung nach der Ganzzell („whole-cell“) Membranfleck („patch-clamp“; PCL) Technik (Hamill et al. 1981) durchgeführt. Dabei wurden die elektrophysiologischen Techniken der Stromklemme („current-clamp“, CC) und der Spannungsklemme („voltage-clamp“, VC) verwendet.

#### **3.2.1 Anfertigen der Hirnschnitte**

Die Präparation der Hirnschnitte folgte im wesentlichen der von Grothe & Sanes (1993) beschriebenen Methode. Das Tier wurde zunächst mit einer letalen Dosis Chloralhydrat (5%ig, 0,1ml/g Körpergewicht) betäubt. Sobald das Tier keine Reaktion auf taktile Reize mehr zeigte wurde der Kopf mit einer Schere abgetrennt. Der Kopf wurde daraufhin sofort für einige Sekunden in eisgekühlte (0° – 4° C), mit Sauerstoff angereicherte (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit (Präparations- (p) ACSF; entweder mit einer hohen Konzentration von Magnesiumionen, pACSF<sub>1</sub>; oder zusätzlich dazu mit einer niedrigen Konzentration an Natriumionen und hoher Konzentration an Saccharose, pACSF<sub>2</sub>; Zusammensetzung s.h. Tab. 13) getaucht um den Metabolismus der Zellen zu

verlangsamen und ein Absterben der Zellen zu verhindern. Der Schädel über dem Cortex wurde entlang der Mittellinie von rostral nach caudal geöffnet und der Schädelknochen entfernt. Durch einen dorsalen Schnitt entlang des Schädelknochens, beginnend am Cerebellum in Richtung Rückenmark wurde das Stammhirn freigelegt. Um das Gehirn entnehmen zu können, wurden die beiden knöchernen Bullae durch zwei Pinzettenschnitte entlang des Cerebellums zur Seite weggebrochen. Daraufhin erfolgte eine erste Trimmung des Gehirns, mit einem Skalpells wurde dazu der Cortex etwas rostral zum Cerebellum quer durchgeschnitten. Daraufhin wurde mit einem gebogenen Spatel der Teil caudal zum Schnitt (enthält Cortex, Cerebellum und Stammhirn) vorsichtig herausgeklappt und in eiskühlte pACSF gelegt. Um ein Austrocknen des Gehirns und damit ein Absterben der Zellen zu verhindern, wurde das Gehirn während der Präparation immer wieder kurz in eiskühlte pACSF getaucht. Nach der Entnahme des getrimmten Gehirns wurden mit einer Pinzette vorsichtig die beiden verbliebenen Cortexhemisphärentteile, sowie das Cerebellum und die Pia Mater über dem Stammhirn entfernt. Das Entfernen der Pia Mater war notwendig um das Gewebe schneiden zu können, ohne dass das Messer Druck auf das Stammhirn ausübt, was wiederum zu einem Absterben der Zellen führen könnte. Das so präparierte Gewebestück wurde mit seiner dorsalen Seite mit Sekundenkleber an die V-förmig eingeschnittene Vorderkante eines Agarblöckchens (3% Agar, Höhe ca. 1 cm) geklebt, das Blöckchen wurde ebenso auf die Schneideplatte geklebt. Die Schneideplatte wurde in der eiskühlten Schneideschale am Vibratom (VT 1000 S, Leica, Wetzlar, Deutschland) verschraubt und die Schale daraufhin mit eiskühlter pACSF aufgefüllt. Das Gewebe wurde daraufhin am Vibratom bei sehr niedriger Vorschubgeschwindigkeit unter Verwendung eines Einkristall - Saphirmessers (DDK, Wilmington, DE, USA) ab dem absteigenden Ast des Facialisnervens von ventral nach rostral mit einer Schnittdicke von 250 – 350 µm geschnitten. Pro Tier wurden ca. 4 – 5 coronale Schnitte durch den SOC angefertigt. Die Lage des SOC im Stammhirn war deutlich an dem hell weißen Streifen der am ventralen Rand des SOC verlaufenden Axonbündel zu erkennen. Jeder Schnitt wurde sofort nach dem Schneiden entnommen und in einer Aufbewahrungskammer bei 32°C für 30 min entweder in pACSF<sub>1</sub>, wenn diese vorher zur Präparation verwendet wurde, oder in normaler, mit Sauerstoff angereicherter (n) ACSF inkubiert. Nach der Inkubation bei 32°C wurden die Schnitte für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und bis zur elektrophysiologischen Untersuchung in pACSF<sub>1</sub> oder nACSF bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Die gesamte Präparation musste sehr schnell erfolgen, um möglichst viele lebende und gesunde Zellen zu erhalten. Die gesamte Zeitdauer vom Abtrennen des Kopfes bis

zum Entnehmen des ersten Hirnschnitts betrug maximal fünf Minuten. Während der Präparation war besonders darauf zu achten keinen Zug oder Druck auf das Gehirn auszuüben, da dies zu einem Absterben der Zellen führen kann.

### 3.2.2 Aufbau der *in vitro* Versuchsanordnung

Zur Durchführung der elektrophysiologischen Ableitungen wurde ein Hirnschnitt in die Ableitkammer transferiert und kontinuierlich mit Sauerstoff angereicherter nACSF überspült. Der Hirnschnitt wurde durch einen mit feinen Nylonfäden bespannten Platinring in der Kammer fixiert. Das Einströmen der nACSF in die Ableitkammer erfolgte durch Gravitation, wobei eine Durchflussrate von ca. 8 – 10 ml pro min mittels eines regelbaren Durchflussmessgeräts (10A6131/41, ABB Automation Products, Göttingen, Deutschland) eingestellt wurde. Die Applikation der verschiedenen, in nACSF gelösten Pharmaka erfolgte durch mehrere Schläuche, die durch Hähne geregelt in das Perfusionssystem mündeten. Das Kammervolumen von ca. 1 – 1,5 ml wurde durch eine selbstregelnde Heizung mit Messfühler (Eigenbau der Elektronikwerkstatt am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) ständig auf einer Temperatur von  $32^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$  gehalten. Alle Ableitungen wurden bei dieser Temperatur durchgeführt.

Die SOC-Nuclei und einzelne Zellen konnten in den Hirnschnitten mittels eines über der Ableitkammer installierten aufrechten Mikroskops (Zeiss Axioskop 2 FS plus, Carl Zeiss Jena, Jena, Deutschland) unter Verwendung eines 10-fach (Zeiss Achroplan, NA 0,3) und 40-fach (Zeiss Achroplan, NA 0,8) Wasserimmersionsobjektivs und von differentieller Interferenzkontrastoptik (DIC, Zeiss) identifiziert werden. Durch Kombination von DIC und Infrarotvideomikroskopie (IRDIC) konnten einzelne Neurone mit einer CCD-Kamera (KP-M2R, Hitachi Kokusai Electric, Tokyo, Japan) aufgenommen und auf einem Videomonitor (PVM-145E, Sony, Tokyo, Japan) dargestellt werden (nach Stuart et al., 1993). Die Stimulations- und Ableitelektroden wurden unter optischer Kontrolle durch ein System von mehrachsigen, motorisierten und ferngesteuerten Mikromanipulatoren (Mini 25 System, Luigs & Neumann, Ratingen, Deutschland) in den Hirnschnitten platziert.

### 3.2.3 Identifizierung der MSO in den *in vitro* Experimenten

In den Hirnschnitten war die MSO als prominenter Nucleus an Hand des charakteristischen dorso – ventral verlaufenden Zellkörperstreifens, der sich als eher transparente Struktur vom umgebenden Gewebe abhob, erkennbar. Daneben konnte die MSO auch durch die Lage der lateral (LSO) und medial (MNTB) angrenzenden Nuclei identifiziert werden. Unter höherer Vergrößerung konnten die Zellen oftmals durch ihre bipolaren Dendriten

als typische MSO-Neurone identifiziert werden.

Um zu bestätigen, dass die abgeleiteten Zellen MSO-Neurone waren und um diese basierend auf ihrer Morphologie als PC-Zellen oder NPC-Zellen („nonprinciple cells“; Smith 1995) zu klassifizieren, wurde bei einigen Experimenten die Markierungssubstanz Neurobiotin (0,2%, Vector, Burlingame, CA, USA) zur Elektrodenlösung gegeben. Während der Ableitung diffundiert das Neurobiotin in die Zelle und reichert sich sowohl im Soma als auch in den Dendriten an. Die Hirnschnitte mit den so markierten Zellen wurden nach Beendigung des Experiments in 4% Paraformaldehyd bei 4°C für 5 – 10 Tage fixiert und das Neurobiotin mittels einer immunhistochemischen Reaktion nachgewiesen und angefärbt (s.h. Kapitel 3.1.2.4). Die so markierten Zellen wurden dann lichtmikroskopisch entweder durch konfokale Laser-scanning Mikroskopie (s.h. Kapitel 3.1.3.1) oder durch klassische Lichtmikroskopie (s.h. Kapitel 3.1.3.2) analysiert.

### **3.2.4 Verwendete Lösungen und Pharmaka**

#### **3.2.4.1 Zusammensetzung der verwendeten artifiziellen**

##### **Cerebrospinalflüssigkeiten**

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 erwähnt, wurden zur Präparation und während der Ableitungen verschiedene artifizielle Cerebrospinalflüssigkeiten (ACSF) verwendet. Für alle Experimente wurde bei den Ableitungen eine Standard / Normale (n) ACSF verwendet. Dieser nACSF wurden gegebenenfalls die unten beschriebenen Pharmaka zugesetzt. Zur Präparation wurde entweder eine Lösung mit, im Vergleich zur nACSF, erhöhter Magnesiumionen-Konzentration (pACSF<sub>1</sub>) oder eine Lösung mit zusätzlich dazu erniedrigter Natriumionen- und hoher Saccharose-Konzentration (pACSF<sub>2</sub>) verwendet. Die Verwendung dieser speziellen Lösungen sollte während der Präparation ein Absterben von Zellen verhindern, da zum einen durch die erhöhte Magnesiumionen-Konzentration NMDA-Rezeptoren blockiert werden (Ault et al. 1980), zum anderen durch das Ersetzen von Natriumionen durch Saccharose osmotisch bedingter Stress an den Zellen vermindert wird (Aghajanian & Rasmussen 1989). Die Zusammensetzung der verschiedenen Badlösungen ist in Tabelle 13 zusammengefasst.

**Tabelle 13:** Zusammensetzung der verwendeten artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeiten (ACSF)

Art der externen Badlösung (ACSF)	Normale (n)ACSF	Präparations-(p)ACSF <sub>1</sub>	Präparations-(p)ACSF <sub>2</sub>
NaCl (mM)	125,0	125,0	85,0
KCl (mM)	2,5	2,5	2,5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mM)	1,25	1,25	1,25
NaHCO <sub>3</sub> (mM)	26,0	26,0	25,0
Saccharose (mM)	-	-	75,0
Glucose (mM)	25,0	25,0	25,0
CaCl <sub>2</sub> (mM)	2,0	2,0	0,5
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1,0	4,0	4,0
Ascorbinsäure (mM)	-	-	0,5
Osmolarität (mOsm)	310 – 320	310 – 320	320 – 330

Die nACSF ist die Standardbadlösung, die bei allen Experimenten während der Ableitungen eingesetzt wurde und in der die Hirnschnitte nach der Präparation mit pACSF<sub>2</sub> aufbewahrt wurden. Gegebenenfalls wurden der nACSF während der Ableitungen die unten beschriebenen Pharmaka zugesetzt. Die Präparations- (p) ACSF wurde nur während des Anfertigens der Hirnschnitte verwendet, pACSF<sub>1</sub> war die Badlösung in der im Vergleich zur nACSF nur die Magnesiumionen-Konzentration erhöht wurde. Bei pACSF<sub>2</sub> wurde zusätzlich zu dieser Erhöhung die NaCl Konzentration erniedrigt und die daraus resultierende Verminderung der Osmolarität mit Saccharose kompensiert. Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer (Knauer, Berlin, Deutschland) bestimmt. Der pH-Wert nach äquilibrieren mit 95% O<sub>2</sub> / 5% CO<sub>2</sub> für 30 min lag für alle Lösungen bei 7,4. Die Ionenzusammensetzungen der verschiedenen Badlösungen stammen aus Protokollen von U. Koch (nACSF, pACSF<sub>1</sub>) und P. Monsivais (pACSF<sub>2</sub>).

### 3.2.4.2 Zusammensetzung der verwendeten internen Elektrodenlösungen

Bei den Experimenten wurden drei verschiedene interne Elektrodenlösungen verwendet. Die Wahl der Elektrodenlösung richtete sich zum einen nach der Art des PCL-Experiments (CC- oder VC-Modus), zum anderen konnte durch eine Variation der Chloridionen-Konzentration in der Elektrode und damit auch in der Zelle das Umkehrpotential der inhibitorischen postsynaptischen Ströme (IPSC) verändert werden. Die interne Chloridionen-Konzentration wurde bei manchen VC-Versuchen im Vergleich zur natürlich in den Zellen vorkommenden Konzentration erhöht (Tab. 14). Die damit einhergehende Erhöhung der treibenden Kraft („driving force“) für Chloridionen führte zu größeren, besser zu messenden synaptischen Strömen, was wiederum zu einer besseren Charakterisierung der IPSCs von Vorteil war.

Um die Kinetik der, durch eine Aktivierung von inhibitorischen Glycinrezeptoren hervorgerufenen Ströme genau und isoliert analysieren zu können, musste während der VC-Experimente die Spannungsklemme der Zellen möglichst gut sein, daher musste der Einfluss von, durch Kaliumkanalaktivität hervorgerufenen Strömen ausgeschlossen werden. Zu diesem Zweck wurden bei VC-Experimenten die Kaliumkanäle durch Zugabe von Cäsiumsalzen zur internen Elektrodenlösung blockiert. Viele der spannungsgesteuerten Kaliumkanäle sind im physiologischen Bereich um das

Ruhemembranpotential der Zellen zu einem gewissen Grad geöffnet, durch diese Kaliumleitfähigkeiten erniedrigt sich der Membranwiderstand ( $R_m$ ) der Zellen. Das hat zur Folge, dass die Zellen elektronisch nicht kompakt wirken. Jede Änderung der Spannung über der Membran führt zu einer Änderung des Öffnungszustandes der Kanäle und damit zu einer Erhöhung oder Verminderung der Leckströme. Im VC-Modus soll durch einen vom Verstärker durch die Elektrode injizierten Strom das Potential der Zellen auf einem definierten, konstanten Niveau gehalten werden. Um ein gutes VC zu erreichen ist es Voraussetzung, dass  $R_m \gg R_s$  ( $R_s$  = Serienwiderstand, s.h. auch Kapitel 3.2.5). Die Wirkung der Kaliumleitfähigkeiten ( $R_m$  wird kleiner) vermindert nun aber deutlich die Qualität dieser Spannungsklemme. Dies zeigt sich besonders im sog. „space-clamp Fehler“, d.h. aufgrund der aktiven Leitfähigkeiten kann der Verstärker die Spannung über der Membran nicht in allen räumlichen Kompartimenten der Zelle gleichermaßen kontrollieren. Dies stellt besonders bei großen und verzweigten Zellen ein Problem dar, da hier die Spannungsklemme oft nur am Soma wirken kann, die Dendriten aber werden mit zunehmendem Abstand vom Soma nicht mehr vom VC erfasst. Diese räumliche Inhomogenität des VC („space-clamp Fehler“) führt daher zu falschen Messungen der untersuchten synaptischen Eigenschaften. So kann beispielsweise, wenn die Spannung einer peripher gelegenen Synapse unzureichend geklemmt wird, das Umkehrpotential eines bestimmten Ions lokal vom am Soma gemessenen Wert abweichen. Es können auch Filterwirkungen entstehen, die den Zeitverlauf eines synaptischen Potentials künstlich verlangsamen können. Eine gute Spannungsklemme der Zellen ist daher zur Messung von schnellen Zeitkonstanten synaptischer Ströme absolut notwendig. Durch die Verwendung von Cäsiumsalzen, die nicht membranpermeabel sind, lässt sich nun eine deutliche Verbesserung des VC erzielen, da die Zellen durch die Blockade der Leckströme elektronisch kompakter werden ( $R_m$  wird sehr viel größer). Dies wiederum führt zu einer größeren räumlichen Homogenität der Spannungsklemme über der gesamten Zelle.

Zur Durchführung von CC-Experimenten wurde eine Kaliumgluconat basierte Elektrodenlösung verwendet. Zur Durchführung von VC-Experimenten wurden neben der Kaliumgluconat Lösung hauptsächlich eine Cäsiumchlorid ( $\text{CsCl}$ ) basierte Elektrodenlösung und eine Cäsium-Methylsulfonat ( $\text{CsMeSO}_4$ ) /  $\text{CsCl}$ -Mischlösung verwendet. Die Zusammensetzungen der internen Elektrodenlösungen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.



Nach der Nernst'schen Gleichung für Chlorid

$$E_{Cl^-} = -\frac{R \times T}{F \times z} \times \ln \left( \frac{[Cl^-]_{\text{außen}}}{[Cl^-]_{\text{innen}}} \right)$$

$$R \text{ (Gaskonstante)} = 8,314 \frac{\text{J}}{\text{mol} \times \text{K}}; F \text{ (Faradaykonstante)} = 9,649 \times 10^4 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$$

$$T \text{ (bei } 32^\circ\text{C)} = 305 \text{ K}; z \text{ (Ladungszahl)} = 1$$

ergab sich für die Kaliumgluconat-Lösung ein Chloridionen-Umkehrpotential ( $E_{Cl^-}$ ) von ca. -86 mV, was in etwa dem natürlich in den Zellen vorkommenden Umkehrpotential für Chlorid entspricht (Smith et al. 2000). Für die auf Cäsiumsalzen basierenden Lösungen ergaben sich Chloridionen-Umkehrpotentiale von ca.  $\pm 0$  mV (CsCl) und von ca. -24 mV (CsMeSO<sub>4</sub> / CsCl).

**Tabelle 14:** Zusammensetzung der verwendeten internen Elektrodenlösungen

Art der internen Elektrodenlösung	Kaliumgluconat	CsCl	CsMeSO <sub>4</sub> / CsCl
Kaliumgluconat (mM)	130	-	-
KCl (mM)	5	-	-
CsCl (mM)	-	140	50
CsMeSO <sub>4</sub> (mM)	-	-	75
HEPES (mM)	10	10	10
EGTA (mM)	1	10	10
NaCl (mM)	-	2	2
CaCl <sub>2</sub> (mM)	-	1	1
Na <sub>2</sub> -ATP(mM)	2	-	-
Mg-ATP (mM)	2	2	2
Na <sub>3</sub> -GTP (mM)	0,3	0,3	0,3
Na <sub>2</sub> -Phosphocreatin (mM)	10	-	-
Osmolarität (mOsm)	280	290	290
[Cl <sup>-</sup> ] (mM)	5	144	54
Flüssigkeits-Brückenpotential (mV)	11,6	0,9	0,6

Die Kaliumgluconat-Lösung wurde hauptsächlich für CC-Untersuchungen, die CsCl und die CsMeSO<sub>4</sub> / CsCl Lösung wurden ausschließlich für VC-Untersuchungen verwendet. Bis auf wenige Ausnahmen wurden alle VC-Experimente mit den Cäsiumsalze enthaltenden Elektrodenlösungen durchgeführt. Bei manchen Experimenten wurden der CsCl und CsMeSO<sub>4</sub> / CsCl Lösung 5mM N-(2,6-Dimethylphenylcarbonylmethyl)triethylammoniumbromid (QX 314, intrazellulärer Blocker spannungsgesteuerter Natriumkanäle) zugesetzt. Der pH-Wert der Lösungen von 7,3 wurde mittels KOH bzw. CsOH eingestellt. Die Osmolarität wurde mit einem Osmometer (Knauer, Berlin, Deutschland) bestimmt. Die verschiedenen durch die Lösungen eingestellten intrazellulären [Cl<sup>-</sup>] resultierten in unterschiedlichen Umkehrpotentialen der IPSPs / IPSCs (s.h. oben). Die extrazelluläre [Cl<sup>-</sup>] lag bei konstant 133,5 mM (s.h. Badlösungen Tab. 13). Das Flüssigkeits-Brückenpotential der verschiedenen Lösungen wurde an Hand der Ionenzusammensetzung unter Verwendung der JPC-Funktion der Clampex 8.1.0.12 Software (Axon Instruments, Union City, CA, USA) berechnet. Die Ergebnisse der Ableitungen wurden entsprechend korrigiert. Die Ionenzusammensetzungen der Lösungen stammen aus Protokollen von U. Koch (Kaliumgluconat), sowie aus Arbeiten von Mitchell & Silver (2000a,b; CsCl, CsMeSO<sub>4</sub> / CsCl).

### 3.2.4.3 Verwendete Pharmaka

Um spezifisch glycinerge IPSPs oder IPSCs zu isolieren und gegebenenfalls zu blockieren wurde ein breites Spektrum an selektiven Antagonisten zur Blockierung von erregenden (AMPA, NMDA) sowie hemmenden (GABA<sub>A</sub>, Glycin) Neurotransmitter-Rezeptoren und Ionenkanälen verwendet. Zur Verbesserung des VCs wurden Kaliumkanäle blockiert, selektive Ionenkanalantagonisten richteten sich gegen spannungsgesteuerte Natriumkanäle und hyperpolarisations-induzierte-Kationenkanäle ( $I_h$ , HCN-Kanäle). Bis auf die Kalium- und Natriumkanalantagonisten wurden alle Antagonisten der nACSF während der Ableitungen zugesetzt. Tabelle 15 fasst die verwendeten Antagonisten und ihre Spezifität zusammen.

**Tabelle 15:** Zusammenfassung der verwendeten Antagonisten und Blockersubstanzen

AMPA-Rezeptor	NMDA-Rezeptor	GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	Glycin-Rezeptor	Kaliumkanäle	Natriumkanäle	$I_h$ (HCN-Kanäle)
CNQX [10 $\mu$ M]	D-APV [50 $\mu$ M]	Gabazine [3 $\mu$ M]	Strychnin [0,5 $\mu$ M]	Cäsiumsalze [125 – 140 mM]	QX 314 [5 mM]	ZD7288 [5 $\mu$ M]
DNQX [10 $\mu$ M]	(+)MK 801 maleate [5 $\mu$ M]					
NBQX [5 $\mu$ M]	5,7-dichloro kynuren säure [5 $\mu$ M]					
Kynuren säure [5 mM]	Kynuren säure [5 mM]					

Dargestellt sind die verschiedenen Antagonisten (Spalten) die zur Blockierung der Neurotransmitterrezeptoren und der Ionenkanäle (oberste Reihe) verwendet wurden. Die verwendeten Konzentrationen sind in Klammern unterhalb der jeweiligen Antagonisten angegeben. Ausgenommen die Kalium- und Natriumkanalblocker stellen sie die Endkonzentration in der nACSF dar. Bei Kalium- und Natriumkanalblockern stellen sie die Endkonzentration in der internen Elektrodenlösung dar. Während der Experimente wurden nicht alle Antagonisten zugleich eingesetzt. Es wurde aber immer ein Gemisch verwendet, das zumindest einen der AMPA- und NMDA-Rezeptor-Antagonisten enthielt. Da 5,7-dichlorokynurensäure nur die Glycinbindungsstelle am NMDA-Rezeptor und damit nicht den gesamten Rezeptor blockiert, wurde sie nur in Kombination mit D-APV und (+)MK 801 maleate eingesetzt. In einigen Experimenten wurde nur Kynurensäure, ein unspezifischer Breitbandantagonist, zur Blockierung von AMPA- und NMDA-Rezeptoren verwendet. Die AMPA-, NMDA-, GABA<sub>A</sub>-, Glycinrezeptor- und  $I_h$ -Antagonisten (außer Kynurensäure) wurden in ddH<sub>2</sub>O zu einer Konzentration von 10 mM gelöst, aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt. Pro Experimenttag wurden frische Aliquots verwendet. Bis auf Strychnin, Cäsiumsalze, QX 314 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), sowie Kynurensäure (Fluka, Deisenhofen, Deutschland) wurden die Antagonisten und Blockersubstanzen von Tocris-Cookson, Bristol, UK bezogen (s.h. Kapitel 6.2.6).

### 3.2.5 Elektrophysiologie

Zur Charakterisierung der intrinsischen Eigenschaften sowie der synaptischen Potentiale und Ströme wurden Ganzzell-PCL-Ableitungen von visuell identifizierten MSO-Neuronen durchgeführt. Die PCL-Elektroden wurden aus Borosilicatglaskapillaren mit Filament und Standardwandstärke (GC150F-10, Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) mittels eines Vertikalpullers (PP-830, Narishige, Tokyo, Japan) angefertigt. Der Widerstand an der Spitze der Elektrode, gemessen mit den verschiedenen internen Elektrodenlösungen in nACSF, betrug 4 – 7 M $\Omega$ . Die elektrophysiologischen Ableitungen wurden mit einem Axon Multiclamp 700A PCL-Verstärker (Axon Instruments, Union City, CA, USA) im CC- und VC-Modus durchgeführt. Vor dem Durchbrechen der Membran und damit dem Erreichen der Ganzzell-Konfiguration wurde durch Anlegen von Unterdruck ein sehr hoher Abdichtwiderstand („seal“) zwischen Elektrode und Zelle (> 1 G $\Omega$ ) herbeigeführt.

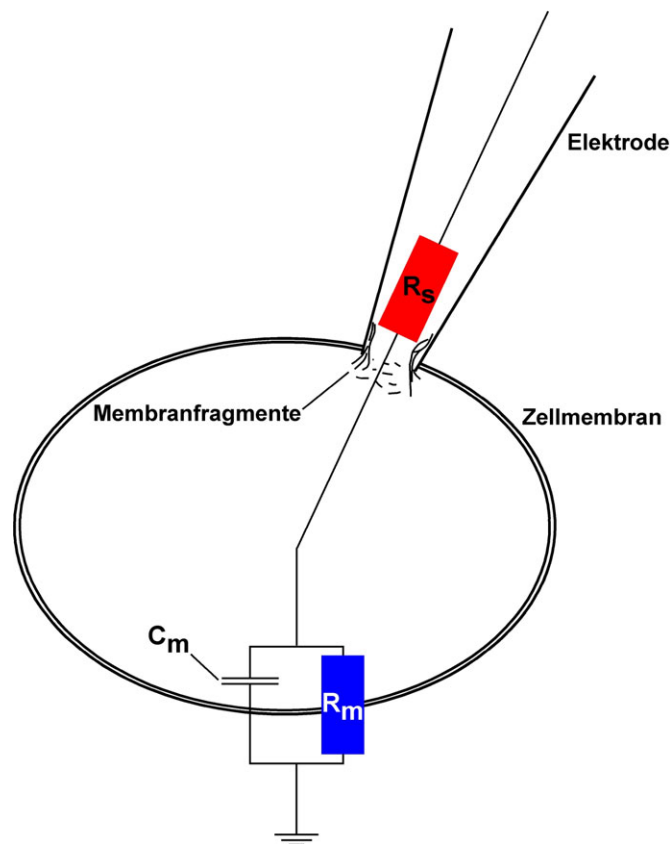
Während der CC-Ableitungen wurde der Brückenabgleich durchgehend verwendet, die Kapazitäten der Elektroden und der Zellen wurden kontinuierlich kompensiert. Im Normalfall fanden die Ableitungen am vorliegenden Ruhepotential der Zellen statt. In Einzelfällen, wenn das Ruhepotential der Zellen etwas zu stark depolarisiert war (> -40 mV), wurde das Potential durch injizieren von Strom durch die Elektrode (max. -100 pA) etwas mehr in Richtung einer Hyperpolarisation verschoben.

Zur Untersuchung der intrinsischen zellulären Eigenschaften der Neurone (Eingangswiderstand, passive Membranzeitkonstante, I / V-Kurven) wurden während der Ableitungen im CC-Modus mittels des Verstärkers depolarisierende oder hyperpolarisierende Strompulse steigender Intensität (-4300 – +4300 pA) durch die Elektrode injiziert.

Bei den VC-Ableitungen lag der Serienwiderstand ( $R_s$ ) zwischen 8,8 – 32,6 M $\Omega$ , bei einem Serienwiderstand größer 38 M $\Omega$  wurde das Experiment abgebrochen. Der Serienwiderstand wurde während des gesamten Experiments kontrolliert und zu 60 – 90% bei einer Bandbreite von 0,89 – 3,7 kHz kompensiert (Multiclamp 700A). Die Kapazitäten der Elektroden und der Zellen wurden während der Experimente kontinuierlich kompensiert. Ein möglichst niedriger Serienwiderstand ist von essentieller Bedeutung für eine korrekte und gute Spannungsklemme bei Ableitungen im Ganzzellmodus. Dies ist besonders wichtig wenn synaptische Ströme mit schnellen Zeitkonstanten gemessen werden sollen. Im Idealfall entspricht der Serienwiderstand ( $R_s$ ) dem Widerstand der Elektrode (Abb. 8), sowie dem in Reihe dazu geschalteten Widerstand des Cytoplasmas. Da über den Cytoplasmawiderstand aber sehr wenig bekannt ist und dieser höchstwahrscheinlich sehr klein sein wird, wird er in den folgenden Überlegungen

vernachlässigt. Der oben genannte Idealfall ( $R_s$  = Widerstand der Elektrode) kommt aber praktisch nicht vor, da beim Durchbrechen der Membran und dem Öffnen der Zelle zwangsläufig Membranbestandteile und / oder andere Zellbestandteile die Öffnung der Elektrode verschmutzen, so dass sich der Widerstand ca. verdoppelt bis verdreifacht. Wenn vom Verstärker eine Spannungsänderung vorgegeben wird, muss die Membranfläche, die einen Kondensator (Abb. 8,  $C_m$ ) darstellt, erst umgeladen werden. Dazu muss kurzzeitig ein hoher Strom in die Zelle injiziert werden, wobei die benötigte Ladungsmenge dabei von  $C_m$  abhängt. Die Geschwindigkeit dieser Umladung wiederum hängt stark vom Serienwiderstand ab. Je geringer  $R_s$ , desto größer ist der Strom der in die Zelle fließt und desto schneller wird die Membran umgeladen, d.h. je kleiner  $R_s$ , desto schneller wird die vorgegebene Spannung in der Zelle erreicht. Dies gilt auch, wenn sich die Leitfähigkeit der Membran zum Beispiel durch einen postsynaptischen Strom sprunghaft ändert. Die Potentialänderung die dieser Strom hervorruft, sollte im VC-Modus durch den Verstärker sofort durch die Injektion eines gleichgroßen, entgegengerichteten Stroms ausgeglichen werden, um wieder das vorgegebene Haltepotential zu erreichen. Dieser entgegengesetzte Kompensationsstrom wiederum stellt die Variable dar, die während der VC-Ableitungen gemessen wird. Der Verstärker kann aber erst mit einer gewissen Verzögerung, die wiederum auch von  $C_m$  und  $R_s$  abhängig ist, reagieren. Da während der Verzögerungszeit das Potential der Zelle vom eingestellten Haltepotential abweicht, können unerwünschte Spannungsschwankungen durch spannungsgesteuerte Kanäle auftreten. Damit wäre der gemessene Kompensationsstrom der synaptisch hervorgerufenen Leitfähigkeitsänderung deutlich verzerrt. Wenn nun  $R_s$  ansteigt, werden zelluläre Leitfähigkeitsänderungen verlangsamt und möglicherweise verändert wiedergegeben. Ein weiterer wichtiger Punkt ist der Zusammenhang zwischen dem Widerstand der Membran (Abb. 8,  $R_m$ ) und dem Serienwiderstand. Nur wenn  $R_s \ll R_m$  ist, liegt das am Verstärker eingestellte Haltepotential auch wirklich in der Zelle vor. Wenn  $R_s$  größer wird, weicht das Potential in der Zelle immer mehr vom Sollwert ab, ohne dass dies am Verstärker angezeigt wird. Aus diesen Gründen ist es essentiell für korrekte Untersuchungen im VC-Modus den Serienwiderstand möglichst gering zu halten. Um den Effekt von  $R_s$  weiter zu minimieren, wird mittels einer aktiven Kompensation durch den Verstärker im Idealfall der Spannungsabfall über  $R_s$  wieder ausgeglichen. Dieser Mechanismus bewirkt beispielsweise, dass der Zeitverlauf eines synaptischen Potentials durch den Kompensationsstrom (s.h. oben) genau und nicht verlangsamt wiedergegeben wird. Durch die Kapazitäten der Elektrode und der Zelle können während des Umladevorgangs der Membran ebenfalls Ströme entstehen, die als Artefakt Einfluss auf die präzise Messung der

synaptisch evozierten Ströme haben. Um diese Artefakte möglichst klein zu halten, werden die Kapazitäten über einen weiteren Regelkreis des Verstärkers kompensiert.

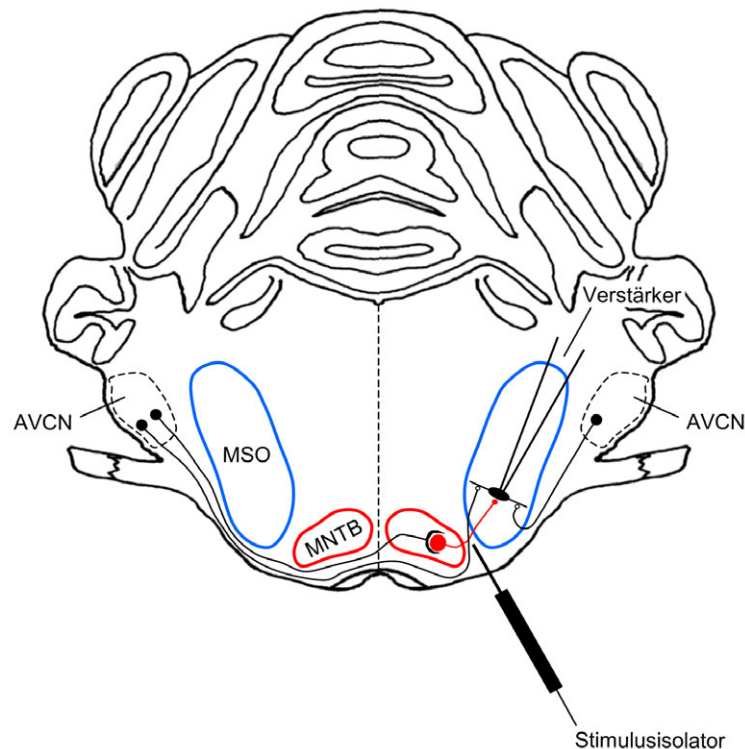


**Abbildung 8:** Elektrischer Schaltkreis der Ganzzell-PCL-Ableitung

Nach dem Durchbrechen der Membran und dem Erreichen der Ganzzell-Konfiguration sind das Zellinnere und die Elektrode elektrisch miteinander gekoppelt. Der Serienwiderstand  $R_s$  entspricht im Idealfall dem Elektrodenwiderstand sowie dem in Reihe geschalteten Cytoplasmawiderstand (hier nicht dargestellt). Durch Membranbestandteile, die beim Durchbrechen der Membran die Elektrodenspitze verschmutzen, erhöht sich  $R_s$  um den Faktor 2 – 3. Die Zellmembran stellt ein RC-Glied dar, bestehend aus der Membrankapazität  $C_m$  und dem Widerstand der Membran  $R_m$ . Für korrekte Ableitungen im VC-Modus sollte  $R_s$  möglichst gering sein. Zu Details s.h. Text. Die Abbildung wurde nach einer Vorlage von Numberger & Draguhn 1996; Abb. 3.6; Seite 88 verändert.

Die Ableitungen der synaptischen Antworten fanden in allen Fällen bei einem Haltepotential von  $-70$  mV statt. Die analogen Aufnahmen wurden mit einem 4-Pol Bessel Tiefpassfilter bei  $2,6 - 10$  kHz (CC) oder  $5 - 10$  kHz (VC) gefiltert, mit einer Abtastfrequenz von  $20 - 50$  kHz über ein Digidata 1322A Interphase (Axon Instruments) digitalisiert und auf einem Computer für weitere Analysen gespeichert. Eine Datei bestand dabei aus mehreren einzelnen Überläufen, pro erfolgter Stimulation wurde ein Überlauf gespeichert. Evozierte synaptische Antworten wurden durch eine elektrische Stimulation der, zu den MSO-Zellen projizierenden MNTB-Axone mittels monopolarer Wolframdrahtelektroden ausgelöst. Die Stimulationselektroden wurden unter optischer

Kontrolle im Faserbündel zwischen dem ipsilateralen MNTB und der MSO platziert (Abb. 9).



**Abbildung 9:** Schema der *in vitro* Ableitungen am Hirnschnitt

Der schematisch dargestellte coronale Stammhirnschnitt enthält beidseits der Mittellinie (gestrichelte Linie) die MSO (blau) und den MNTB (rot). Ganzzell-PCL-Ableitungen wurden von identifizierten MSO-Zellen durchgeführt. Evozierte synaptische Antworten in MSO-Neuronen wurden durch Stimulation des Faserbündels zwischen ipsilateralem MNTB und MSO durch monopolare Stimulationselektroden ausgelöst. Dabei wurden sowohl die Axone der MNTB-Zellen (inhibitorischer Eingang, rot), als auch die Axone von contralateral zur untersuchten MSO gelegenen AVCN-Zellen (exzitatorischer Eingang, schwarz) stimuliert.

Biphasische ( $\pm$ ) elektrische Stimuli von 50 – 200  $\mu$ s Dauer und einer Amplitude von 0,05 – 10 mA wurden mittels einer analogen, optisch isolierten Konstant-Stromquelle (BSI 950, Dagan Corporation, Minneapolis, MN, USA) verabreicht. Das Faserbündel wurde mit einer Frequenz von 0,1 – 0,3 Hz stimuliert. Die Stimulusamplitude wurde so lange graduell erhöht, bis eine postsynaptische alles oder nichts Antwort erkennbar war (minimale Stimulation), die Stimulusamplitude wurde dann weiter graduell soweit erhöht, bis die Amplitude des postsynaptischen Stroms / Potentials ein Maximum erreicht hatte (maximale Stimulation). Zur Durchführung der Messungen wurde im allgemeinen eine Stimulusamplitude nahe des Maximums gewählt.

Die Steuerung des Experiments, die Stimuluskontrolle und die Datenaufnahme erfolgte mit pClamp-Software (Version 8.1.0.12, Axon Instruments).

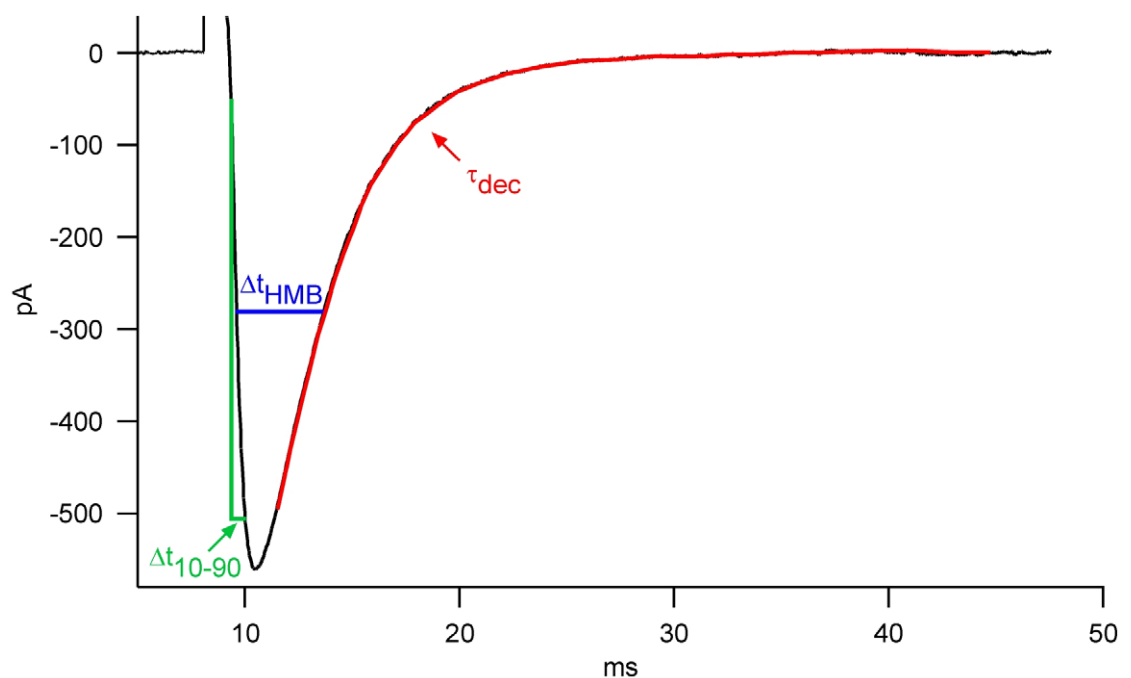
### 3.2.6 Analyse der elektrophysiologischen Daten

Die Analyse der Daten aus den CC- und VC-Experimenten erfolgte unter Verwendung von pClamp- (Version 8.1.0.12, Axon Instruments) und IGOR-Pro-Software (Version 4.0.3.0 WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA). In IGOR wurden dazu ein implementiertes Makro zur Analyse neurophysiologischer Daten (NeuroMatic, Version 1.1; programmiert von J. Rothman, University College London), sowie weitere individuell angefertigte Auswertroutinen (programmiert von U. Koch, Max-Planck-Institut für Neurobiologie) verwendet.

Das Ruhemembranpotential der Zellen wurde unmittelbar nach dem Aufbrechen der Zellmembran und Erreichen der Ganzzell-Konfiguration gemessen. Zur Untersuchung des Eingangswiderstandes ( $R_{in}$ ) und der passiven Membranzeitkonstante ( $\tau_{Membran}$ ) der Zellen wurde während der Ableitung im CC-Modus ein depolarisierender oder hyperpolarisierender Rechteckstimpuls mit einer Amplitude von 100 oder 300 pA durch die Elektrode injiziert. An Hand der darauffolgenden Spannungsänderung über der Zellmembran wurde der Eingangswiderstand der Zelle am Maximum der Spannungsamplitude nach dem Ohmschen Gesetz berechnet. Zur Bestimmung der passiven Membranzeitkonstante wurde die Zeit berechnet, welche die Spannungsänderung über der Membran benötigt, um, ausgehend vom Minimum am Beginn des Rechteckpulses, 63% ihres Maximalwertes zu erreichen. Die Strom / Spannungsbeziehung (I / V-Kurven) der MSO-Zellen wurde an Hand der, während der CC-Ableitungen durch die Elektrode injizierten Rechteckstimpulse steigender Intensität (-4,3 – +4,3 nA) bestimmt. Dazu wurde die Amplitude der, durch einen bestimmten Strompuls ausgelösten Spannungsantwort sowohl an ihrem Maximum unmittelbar nach dem Beginn des Strompulses, als auch in der stationären Phase der Spannungsänderung (nach 150 oder 450 ms) gemessen. Die Zeitdauer der, durch die Injektion von depolarisierenden Rechteckstimpulsen, ausgelösten Aktionspotentiale wurde an ihrer Basis bestimmt. Die Basis der Aktionspotentiale entsprach dabei dem Membranpotential, an dem die Aktivierung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle durch einen charakteristischen Knick in der Spannungsspur erkennbar war.

Zur Analyse der Kinetik der synaptischen Antworten wurden insgesamt drei Parameter untersucht (Abb. 10). Bei IPSCs wurde als erster Parameter die Zeitkonstante des exponentiellen Abklingens ( $\tau_{dec}$ ) des Stroms nach elektrischer Stimulation der Eingänge berechnet. Bei den im CC-Modus untersuchten IPSPs dagegen wurde eine Berechnung von  $\tau_{dec}$  nicht durchgeführt, da hier die intrinsischen zellulären Leitfähigkeiten nicht kontrolliert werden können. Aufgrund einer möglicherweise verstärkten Aktivierung

dieser Leitfähigkeiten in der abklingenden Phase der IPSPs könnte wiederum die reine Kinetik der synaptischen Potentiale „verschmiert“ werden. Durch die gleichzeitige Aktivität von intrinsischen und synaptisch evozierten Leitfähigkeiten war daher die signifikante Anpassung einer einfachen oder zweifachen Exponentialfunktion an die abklingende Phase der IPSPs nicht möglich. Zudem trägt jede, der in der abklingenden Phase des IPSPs aktiven Leitfähigkeiten mit unterschiedlichem Gewicht zum  $\tau_{\text{dec}}$ -Wert, den eine solche Anpassungsfunktion liefern würde, bei. Der so berechnete  $\tau_{\text{dec}}$ -Wert wäre deshalb nicht geeignet das Zeitverhalten der synaptisch evozierten Potentialänderung zu beschreiben. Aus diesen Gründen wurde zur Beschreibung der Kinetik der IPSPs auf die Analyse der Zeitkonstante des exponentiellen Abklingens verzichtet und ersatzweise die Zeitdifferenz zwischen Anstieg und Abfall des IPSPs auf Höhe des 50%-Punktes der maximalen Amplitude berechnet (halbmaximale Breite, HMB). Sowohl bei IPSPs, als auch bei IPSCs wurde als zweiter Parameter der Kinetik die Zeit berechnet, in der die Amplitude des IPSPs / IPSCs von 10% auf 90% der maximalen Amplitude anstieg (10 – 90% Anstiegszeit).



**Abbildung 10:** Analyierte Parameter zur Beschreibung der Kinetik von IPSPs und IPSCs

Sowohl bei IPSPs, als auch bei IPSCs wurden je zwei Parameter untersucht. Bei IPSCs wurde die Zeitkonstante des exponentiellen Abklingens des Stroms ( $\tau_{\text{dec}}$ , rot), bei IPSPs ersatzweise die Zeitdifferenz zwischen Anstieg und Abfall des Potentials auf Höhe des 50%-Punkts (halbmaximale Breite HMB, blau) berechnet. Zur Beschreibung des Zeitverhaltens der ansteigenden Flanke des IPSPs / IPSCs wurde die Zeit, in der die Amplitude von 10% auf 90% der maximalen Amplitude zunahm, berechnet (10 – 90% Anstiegszeit, grün).



Wie Abb. 10 zeigt, konnte durch eine Analyse dieser drei Parameter die Kinetik der IPSPs / IPSCs vollständig beschrieben werden. Zur Berechnung der drei Parameter wurden 20 – 145 einzelne, elektrisch stimulierte synaptische Antworten einer Zelle (eine Antwort pro Stimulation) gemittelt. Zur Berechnung von  $\tau_{\text{dec}}$  wurde durch die Software eine einfache, Standard-Exponentialfunktion an das IPSC angepasst, dabei wurden die Chebyshev-Methode und die Levenberg-Marquardt-Methode (pClamp) zur Anpassung verwendet. Die Qualität der Anpassung wurde einerseits graphisch durch Überlagerung des IPSCs und der Funktion sowie andererseits durch den vom Anpassungsalgorithmus berechneten Korrelationskoeffizienten kontrolliert. Die Korrelationskoeffizienten lagen dabei für alle Funktionen zwischen 0,94 – 0,99. Der Bereich in der synaptischen Antwort, an den die Funktion angepasst werden sollte, wurde durch zwei Punkte definiert. Ein Punkt lag im Abfall der Antwort nahe dem Maximum, der zweite Punkt lag im Stationärbereich, mehrere Millisekunden nach dem Zeitpunkt an dem der Strom wieder Null erreicht hatte.

Die numerischen Ergebnisse der Analysen sind entweder als Mittelwert  $\pm$  SEM oder nicht gemittelt als Einzelwerte dargestellt. Die Angabe  $n$  bezieht sich dabei auf die Anzahl der Zellen an denen eine bestimmte Messung durchgeführt wurde. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen wurden mittels einer Statistiksoftware (Statistika 5.1, StatSoft, Tulsa, OK, USA) unter Verwendung des Mann-Whitney U-Tests auf ihre Signifikanz geprüft. Die Ergebnisse wurden ab  $p < 0,05$  als signifikant erachtet. Die Abbildungen der Ergebnisse aus den Analysen (Abb. 31 – 33, 36, 38) wurden ebenso wie die an die Daten in Abb. 32 angepassten Exponentialfunktionen (Simplex-Methode) in Statistica erstellt. Die Abbildungen der CC- und VC-Daten (aufgenommene Überläufe) wurden mit IGOR erstellt, die mittleren synaptischen Antworten wurden aus 74 – 78 Überläufen gebildet (Abb. 35, 37, 39).

## 4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Ontogenie der inhibitorischen Eingänge zu Neuronen der medialen oberen Olive in der Wüstenrennmaus sowohl mit immunhistochemischen als auch mit elektrophysiologischen Methoden untersucht. Vergleichend wurden immunhistochemische Analysen auch in der Ratte als Beispiel eines nicht-ITD-nutzenden Säugetiers durchgeführt.

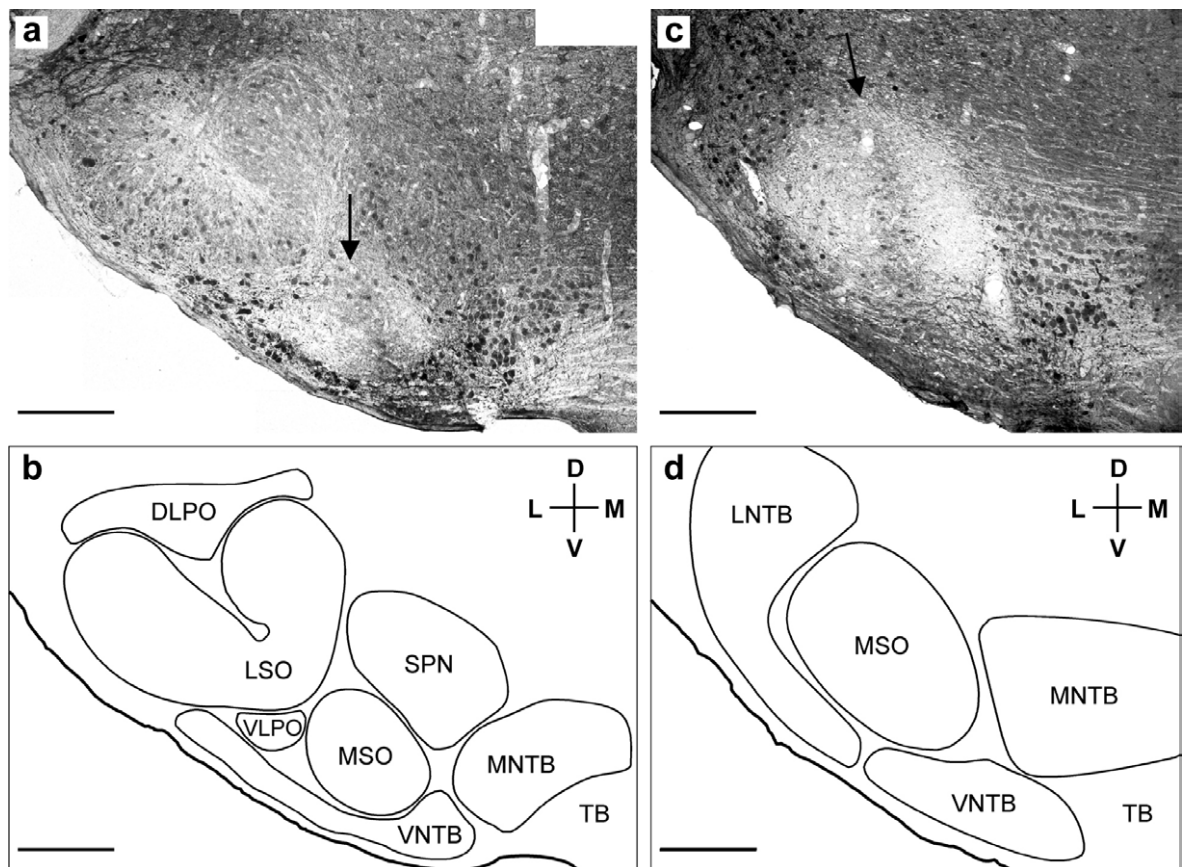
### **4.1 Immunhistochemische Charakterisierung der Entwicklung glycinерger Eingänge zu Neuronen der medialen oberen Olive**

Zum Nachweis der Verteilung inhibitorischer, glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus und der Untersuchung der Entwicklung dieser Verteilung, wurden drei Hauptelemente der glycinерgen Synapsen sowohl prä- als auch postsynaptisch mit verschiedenen Antikörpern markiert. Die Verteilung von präsynaptisch in den Vesikeln vorliegendem Glycin, von postsynaptischen Glycinrezeptoruntereinheiten und dem Ankerprotein Gephyrin wurde analysiert. Das Ankerprotein Gephyrin kommt nur an inhibitorischen Synapsen vor und verankert die Glycinrezeptoren mittels Bindungen zum Cytoskelett in der postsynaptischen Membran unterhalb einer Synapse (Kirsch et al. 1991; Kneussel & Betz 2000). Um zuverlässig die Dendriten der MSO-Zellen sichtbar zu machen, wurden Schnitte mit Antikörpern gegen Glycin und Glycinrezeptoren zusätzlich mit einem selektiven Antikörper gegen das microtubule-associated protein 2 (MAP2) doppelgefärbt. MAP2 ist ein spezifisch in den Dendriten angereichertes Protein des Cytoskeletts, das sich zu einem gewissen Grad auch in den Zellkörpern von Neuronen nachweisen lässt, in Axonen dagegen wird es nur in äußerst geringen Mengen exprimiert (Olmsted 1986; Sanchez et al. 2000). Desweiteren wurde die Existenz inhibitorischer Synapsen (markiert durch eine anti-Gephyrin-Immunreaktion) elektronenmikroskopisch (EM) untersucht. Zum Vergleich wurde bei der adulten Wüstenrennmaus die Verteilung glycinерger Synapsen an SPN- und LSO-Neuronen untersucht.

#### **4.1.1 Allgemeine Anatomie des SOC bei der Wüstenrennmaus**

Wie aus den Übersichtsdarstellungen der jeweils linken Hälfte zweier gegen Glycin gefärbter Coronalschnitte durch die caudale (Abb. 11a) und rostrale Region des SOC (Abb. 11c) sowie den entsprechenden schematischen Zeichnungen (Abb. 11b,d) hervorgeht, setzte sich der obere Olivenkomplex der adulten Wüstenrennmaus aus

mehreren deutlich voneinander abgrenzbaren Kerngebieten zusammen. Im caudalen Bereich des SOC (Abb. 11a,b) ließen sich die drei klar strukturierten SOC-Hauptkerngebiete, der MNTB, die MSO und die LSO unterscheiden.



**Abbildung 11:** Anatomischer Aufbau des SOC der Wüstenrennmaus

Übersichtsaufnahmen der jeweils linken Hälfte zweier gegen Glycin gefärbter Coronalanschnitte durch den caudalen (a) und rostralen (b) Teil des SOC einer adulten Wüstenrennmaus (Glycin – DAB-Färbung; Schnitte in a,b stammen aus dem gleichen Tier). Die spiegelbildlich zur Mittellinie angeordnete rechte Hälfte des SOC ist nicht dargestellt. (a) Im caudalen Teil des SOC der Wüstenrennmaus sind die drei Hauptkerngebiete MNTB, MSO und LSO sowie eine Reihe von periolivären Zellgruppen (VNTB, SPN, VLPO, DLPO) erkennbar. Die MSO der Wüstenrennmaus ist bereits an ihrem caudalen Beginn als prominente Struktur lateral zum MNTB und medio-ventral zur LSO (Pfeil) feststellbar. (b) Im rostralen Teil des SOC der Wüstenrennmaus erreicht die MSO ihre größte dorso-ventrale und medio-laterale Ausdehnung. Zusammen mit dem MNTB und dem LNTB, der ebenfalls in dieser Ebene seine größte Ausdehnung erreicht, stellt sie die dominierende Struktur im ventralen Teil dieses Stammhirnbereichs dar. (a,b) Glycinerge Zellen (schwarz) finden sich im SOC der Wüstenrennmaus in großer Zahl in MNTB, LNTB und VNTB, sowie in geringerer Zahl im lateralen Teil der LSO. Die MSO enthält keine glycinergen Zellen. (c,d) Die Umrisszeichnungen zeigen die Abgrenzung der Kerngebiete in den unter (a) und (b) dargestellten Hirnschnitten. Zu erkennen sind TB (Fasern des Trapezkörpers), MNTB (medialer Nucleus des Trapezkörpers), VNTB (ventraler Nucleus des Trapezkörpers), LNTB (lateraler Nucleus des Trapezkörpers), MSO (mediale obere Olive), SPN (superiorer periolivärer Nucleus), VLPO (ventrolateraler periolivärer Nucleus), LSO (laterale obere Olive) und DLPO (dorsolateraler periolivärer Nucleus). Nomenklatur nach Budinger et al. 2000; Cant & Hyson 1992; Helfert et al. 1991; Schwartz 1992.

D: dorsal; V: ventral; M: medial; L: lateral

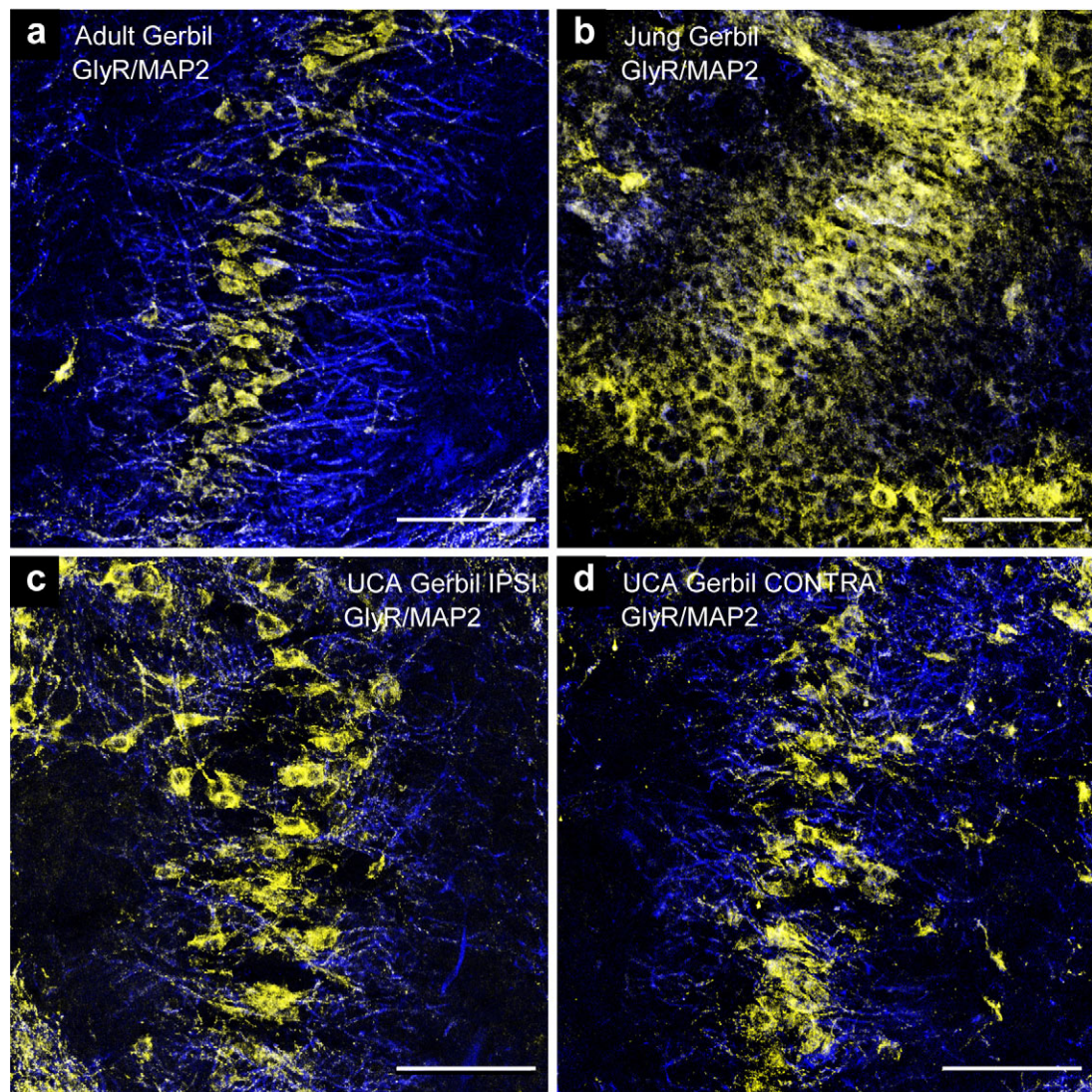
Maßstab: 250 µm

In mehr rostral gelegenen Bereichen des SOC's (Abb. 11c,d) wurde nahezu der gesamte ventrale Teil dieses Stammhirnbereichs von der MSO und dem MNTB dominiert, die LSO war hier nicht mehr zu erkennen. Über die gesamte rostro – caudale Ausdehnung des SOC's waren die Hauptkerngebiete von bis zu zehn, weniger prägnant organisierten, periolivären Zellgruppen umgeben. In der dargestellten caudalen Schnittebene (Abb. 11a,b) waren von diesen der SPN (superiorer periolivärer Nucleus), der VNTB (ventraler Nucleus des Trapezkörpers), der VLPO (ventrolateraler periolivärer Nucleus) und der DLPO (dorsolateraler periolivärer Nucleus) erkennbar. Der LNTB (lateral Nucleus des Trapezkörpers), ein im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Studie bedeutsamer periolivärer Kern, zeigte in der dargestellten rostralen Schnittebene (Abb. 11c,d) seine größte Ausdehnung. Neben dem LNTB war auch der VNTB im rostralen Teil des SOC's feststellbar.

Aufgrund ihrer Größe und Ausdehnung über die gesamte rostro – caudale Achse des SOC's (ca. 1800  $\mu$ m in adulten Tieren ) war die MSO (Pfeil, Abb. 11a,c) neben der LSO der auffälligste Nucleus des SOC's der Wüstenrennmaus. In der dargestellten caudalen Schnittebene (Abb. 11a,b) ist der Beginn der MSO zu erkennen. Im Vergleich zu den anderen erkennbaren Nuclei, besonders der LSO, die ungefähr in dieser Ebene ihre größte Ausdehnung erreichte, war die MSO schon als relativ prominenter Kern erkennbar. Ihre größte Ausdehnung erreichte die MSO im rostralen Teil des SOC's (Abb. 11c,d). In diesem Bereich stellte die MSO aufgrund ihrer Größe und Struktur den auffälligsten Nucleus dar.

#### **4.1.2 Verteilung inhibitorischer glycinерger Eingänge an MSO-Neuronen bei adulten und jungen Wüstenrennmäusen**

Die MSO bei Wüstenrennmäusen gliederte sich in drei Teilbereiche. Zentral im Nucleus waren die Zellkörper der Neurone in einem schmalen, von ventral nach dorsal verlaufenden Zellband angeordnet. Medial und lateral zu diesem Zellband erstreckten sich die Dendriten der Zellen in ein praktisch zellfreies Neuropil (Abb. 11a,c, 12a). Wie die in geringer Vergrößerung aufgenommene Glycinrezeptor – MAP2-Färbung der MSO einer adulten Wüstenrennmaus (Abb. 12a) zeigt, beschränkte sich die deutlich positive Färbung für Glycinrezeptoren (gelb, Abb. 12a) qualitativ nur auf die Zellkörper und äußerst proximalen Bereiche der mittels MAP2-Färbung sichtbar gemachten Dendriten (blau, Abb. 12a). In den mehr distalen Bereichen der Dendriten waren praktisch keine gelb markierten Glycinrezeptoren mehr zu erkennen (Abb. 12a). Betrachtet man dagegen die MSO eines jungen Tieres (P10; Abb. 12b), zeigte sich qualitativ kein Unterschied in der generellen Anatomie der MSO, aber sehr wohl in der Verteilung der Glycinrezeptoren.



**Abbildung 12:** Anatomie der Wüstenrennmaus MSO in den experimentellen Gruppen

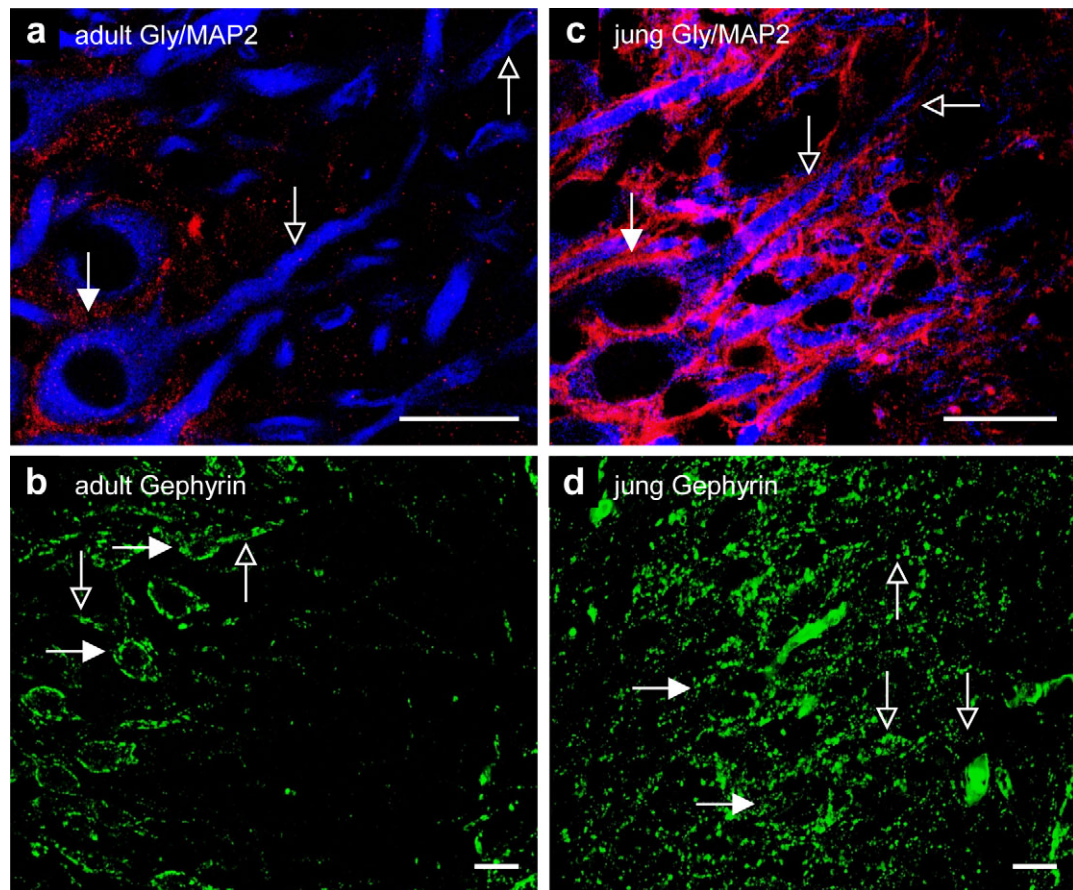
Die konfokalen MIPs zeigen die Verteilung von fluoreszent markierten Glycinrezeptoren (gelb) im Gesamtkernbereich der MSO, die Anordnung der Somata und Dendriten im Nucleus ist durch die Doppelfärbung mit MAP2 (blau) erkennbar. **(a)** Bei adulten Tieren sind die bipolaren MSO-Neurone in einem eng begrenzten dorso – ventralen Zellband angeordnet, die Dendriten der Zellen erstrecken sich nach medial und lateral in ein praktisch zellfreies Neuropil. Positive Färbung für Glycinrezeptoren beschränkt sich bei adulten Tieren auf die Somata und die extrem proximalen Dendriten der MSO-Neurone. **(b)** Bei jungen Tieren (P10; zwei Tage vor Hörbeginn) sind die bipolaren MSO-Neurone in gleicher Weise in einem Zellband organisiert. Markierte Glycinrezeptoren verteilen sich bei jungen Tieren homogen über Somata und gesamte Dendriten. **(c,d)** MSO-Nuclei unilateral vertäubter Tiere (UCA) zeigen eine zu gleichaltrigen Kontrolltieren **(a)** weitgehend vergleichbare Anordnung der Neurone. Sowohl ipsilateral **(c)** als auch contralateral **(d)** zur entnommenen Cochlea liegen die Neurone in einem dorso – ventralen Zellband mit nach medial und lateral ziehenden Dendriten. Deutliche Markierung für Glycinrezeptoren erstreckt sich ipsi- und contralateral nicht nur über den Zellkörperstreifen sondern, im Gegensatz zu normal adulten Tieren **(a)**, auch über weite Teile der lateralen und medialen Dendriten. Maßstab : 100 µm

Diese jungen Wüstenrennmäuse (P10; zwei Tage vor Hörbeginn) können Luftschall noch nicht wahrnehmen (Finck et al. 1972; Woolf & Ryan 1984, 1985) und verfügen daher noch nicht über Hörerfahrung. Allerdings sind die glycinergen Synapsen bei diesem Alter



bereits voll funktional und in ihrer physiologischen Wirkung auf die Zellen hyperpolarisierend also inhibitorisch (Kandler & Friauf 1995b; Sanes 1993). Die Neurone waren auch beim jungen Tier in typischer Weise in einem Zellband organisiert, die Dendriten erstreckten sich orthogonal zu den Zellkörpern in das Neuropil. Aber im Gegensatz zur adulten Wüstenrennmaus verteilten sich die Glycinrezeptoren (gelb, Abb. 12b) beim jungen Tier homogen auf den Zellkörpern und Dendriten (MAP2, blau, Abb. 12b). Nicht nur im Zellband, sondern auch im gesamten dendritischen Neuropil waren gelb markierte Glycinrezeptoren festzustellen.

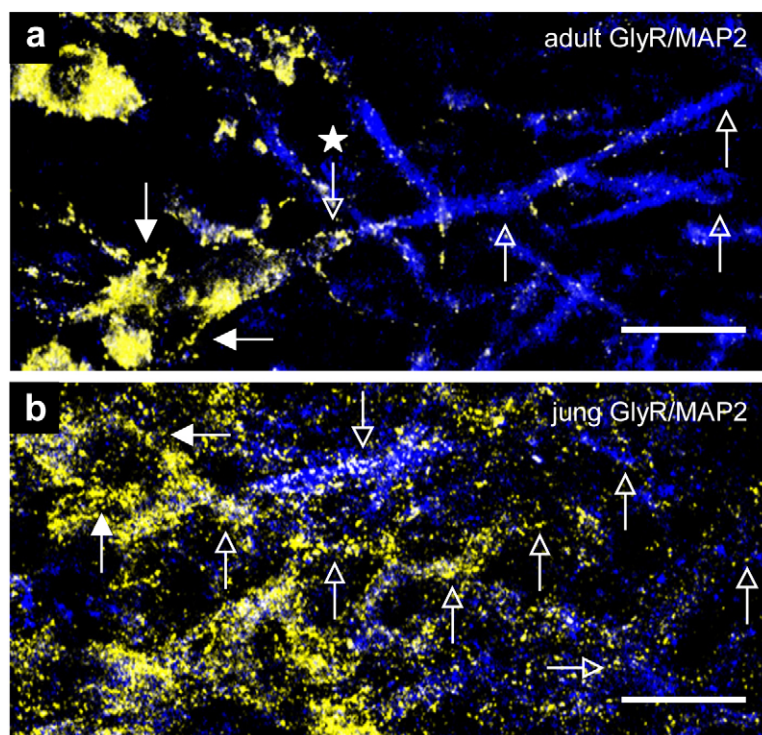
Ein mit diesem Befund übereinstimmendes Bild zeigte sich auch bei der Betrachtung von Einzelzellen in hoher Vergrößerung sowie in der Verteilung der anderen Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes. Sowohl präsynaptisches Glycin, als auch das postsynaptische Ankerprotein Gephyrin wiesen qualitativ dieselbe Beschränkung in ihrer Verteilung auf wie die Glycinrezeptoren. Wie die Einzelzelle in Abb. 13a verdeutlicht, lag positive Färbung für präsynaptisches Glycin (rot) bei adulten Wüstenrennmäusen nur am Soma (gefüllter Pfeil) und den extrem proximalen Dendriten vor. Die weiter distal gelegenen Dendritenabschnitte dagegen (blau, offene Pfeile, Abb. 13a) waren frei von Färbung. Dieses Verteilungsmuster der glycinergen Synapsen bei adulten Wüstenrennmäusen spiegelte sich auch in der Verteilung der postsynaptischen Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes wieder. Positive Färbung für das Glycinrezeptor – Ankerprotein Gephyrin (Abb. 13b, grün) zeigte sich nur an den Zellkörpern (gefüllte Pfeile) und den extrem proximalen Dendriten (offene Pfeile). Im umliegenden dendritischen Neuropil fanden sich nahezu keine markierten Gephyrincluster, es erscheint daher schwarz. Wie die Doppelfärbung in Abb. 14a zeigt, waren Glycinrezeptorpunkta (gelb) in gleicher Weise nur am Soma (gefüllte Pfeile) und an den extrem proximalen Dendritenabschnitten (blau, offener Pfeil mit Stern) konzentriert. Die distaleren Bereiche der Dendriten (blau, offene Pfeile) waren praktisch frei von Färbung. Nur äußerst vereinzelt waren markierte Glycinrezeptorcluster erkennbar. Dagegen zeigte sich bei jungen Tieren am Postnataltag 10 (P10), zwei Tage vor Hörbeginn, qualitativ ein deutlich anderes Muster in der Verteilung der inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen. Im Gegensatz zur adulten Wüstenrennmaus, war bei diesen noch unreifen Tieren eine Beschränkung in der Verteilung der glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen nicht zu beobachten. Alle immunhistochemisch markierten Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes verteilten sich gleichförmig über Zellkörper und Dendriten.



**Abbildung 13:** Verteilung von Glycin und Gephyrin auf MSO-Zellen adulter und junger Wüstenrennmäuse

Konfokale Aufnahmen fluoreszent markierter MSO-Neurone adulter (a,b) und junger (c,d) Wüstenrennmäuse. **(a)** Bei adulten Wüstenrennmäusen findet sich positive Färbung für präsynaptisches Glycin (rot) nahezu ausschließlich am Soma (gefüllter Pfeil) und den extrem proximalen Dendriten (MAP2, blau). Im distalen Dendritenbereich (blau, offene Pfeile) sind dagegen keine positiv markierten glycinergen Boutons erkennbar. **(b)** Auch postsynaptisches Gephyrin (grün) beschränkt sich bei adulten Tieren auf die Zellkörper (gefüllte Pfeile) und die extrem proximalen Dendriten (offene Pfeile). Das dendritische Neuropil ist praktisch frei von Färbung. **(c)** Bei jungen Wüstenrennmäusen ohne Hörerfahrung sind glycinerge Boutons nicht auf die unmittelbare Somaregion beschränkt. Positive Färbung für präsynaptisches Glycin (rot) verteilt sich gleichmäßig über die Somata (gefüllter Pfeil) und die gesamten, mit MAP2 markierten Dendriten (blau, offene Pfeile). **(d)** Gleiches gilt für die Verteilung von postsynaptischem Gephyrin bei jungen Tieren. Markierte Gephyrincluster (grün) finden sich hier sowohl an den Somata (gefüllte Pfeile), als auch im gesamten dendritischen Neuropil (offene Pfeile). Maßstab: 20 µm

Wie Abb. 13c verdeutlicht, war eine markante Färbung für präsynaptisches Glycin (rot) sowohl auf den Zellkörpern (gefüllter Pfeil), als auch auf den gesamten Dendriten (blau, offene Pfeile) erkennbar. Auch die postsynaptischen Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes verteilten sich diffus über der gesamten Zellmembran (Abb. 13d, 14b). So war deutliche Färbung für Gephyrin (grün, Abb. 13d) sowohl an den Zellkörpern (gefüllte Pfeile, Abb. 13d), als auch im gesamten dendritischen Neuropil (offene Pfeile, Abb. 13d) zu finden.



**Abbildung 14:** Verteilung von Glycinrezeptoren auf MSO-Neuronen adulter und junger Wüstenrennmäuse

Konfokale Aufnahmen fluoreszent markierter MSO-Neurone adulter (a) und junger (b) Wüstenrennmäuse. **(a)** Bei adulten Wüstenrennmäusen konzentrieren sich postsynaptische Glycinrezeptoren (gelb) nur am Soma (gefüllte Pfeile) und an extrem proximalen Dendritenabschnitten (MAP2, blau, offener Pfeil mit Stern). Der weitaus größte Teil der Dendriten (blau, offene Pfeile) ist frei von Färbung, nur äußerst vereinzelt sind singuläre Glycinrezeptorcluster (gelb) zu erkennen. **(b)** Bei jungen Wüstenrennmäusen dagegen findet sich massive Färbung für Glycinrezeptoren (gelb) nicht nur am Soma (gefüllte Pfeile) sondern auch auf den gesamten, MAP2-positiven Dendriten der MSO-Neurone (blau, offene Pfeile). Maßstab: 20  $\mu\text{m}$

Die Verteilung von Glycinrezeptoren bestätigte diese Befunde, wie an der Einzelzelle in Abb. 14b zu erkennen, fand sich eine deutliche Färbung von markierten Glycinrezeptoren (gelb) nicht nur am Soma der MSO-Zelle (gefüllte Pfeile) sondern auch auf den gesamten sichtbaren, mit MAP2 markierten, Dendriten (blau, offene Pfeile).

Zur quantitativen Analyse der hier qualitativ beschriebenen Unterschiede in der Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen adulter und junger Wüstenrennmäuse siehe Kapitel 4.1.4.



### **4.1.3 Erfahrungsabhängige Entwicklung der räumlich beschränkten glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus**

Die Beobachtung der Entwicklung räumlich beschränkter glycinergere Eingänge zu MSO-Neuronen bei der Wüstenrennmaus nach Beginn des aktiven Hörens führte zu der Frage, ob dieser Entwicklung ein aktiver Selektionsprozess bestimmter Eingänge zugrunde liegt. Was wiederum zu der spezifischeren Frage führte, ob dieser Prozess von der Erfahrung binauraler, luftschallbasierter Aktivität während der Entwicklung abhängig ist.

Um diesen Frage experimentell nachzugehen wurde bei jungen Wüstenrennmäusen zwei bis fünf Tage vor Hörbeginn (P7 / P10) eine unilaterale Cochleaentnahme durchgeführt (UCA, s.h. Kapitel 3.1.1). Durch diesen Eingriff wurde verhindert, dass die MSO-Neurone während der Entwicklung zeitlich korrelierte Aktivität durch binaural erregende und hemmende Eingänge erfahren. Da durch die einseitige Cochleaentnahme das Einwandern von ectopischen Fasern aus dem ventralen cochlearen Nucleus (VCN) der intakten Seite zum contralateral zur Vertäubung gelegenen MNTB induziert wird (Kitzes et al. 1995; Russell & Moore 1995), sind in der Folge beide MNTBs vom selben Ohr innerviert. Dies wiederum führt zu einer Monauralisierung der inhibitorischen Eingänge zur MSO.

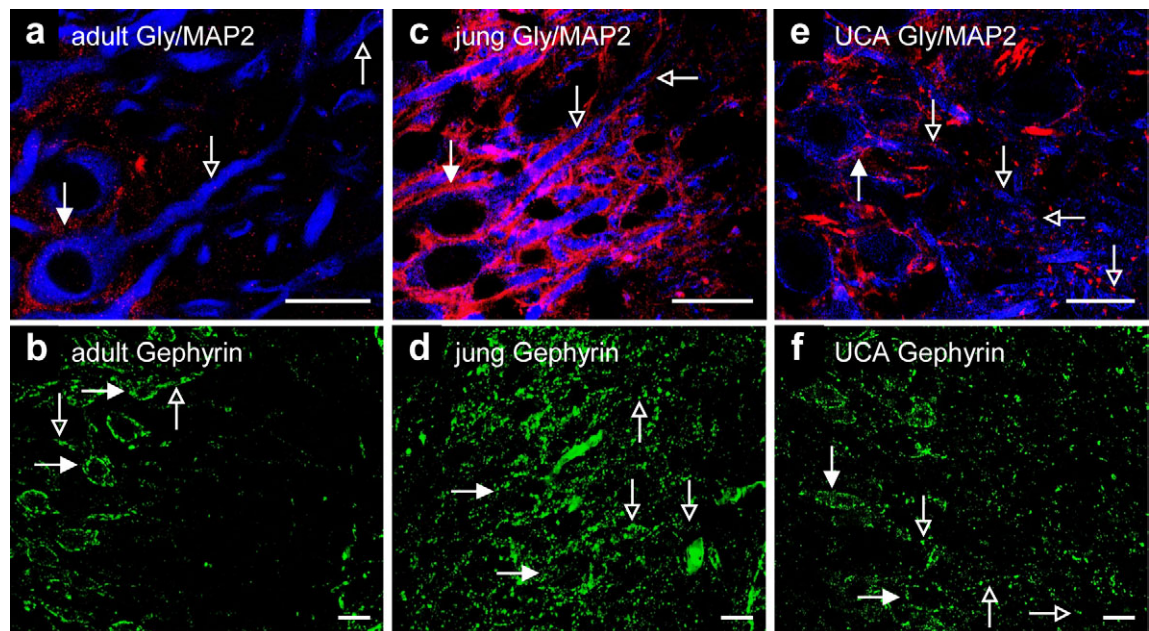
Im Vergleich zu normal adulten und jungen Kontrolltieren (Abb. 12a,b) wies die generelle Anatomie der MSO bei monaural aufwachsenden UCA-Tieren (Abb. 12c,d) keine besonderen Anomalien auf. So war auch bei UCA-Tieren das dorso – ventrale Band der Zellkörper sowie die orthogonal dazu verlaufenden Dendriten zu erkennen (Abb. 12c,d). Allerdings fanden sich im Detail kleinere qualitative Unterschiede, so erschien der Zellkörperstreifen bei einigen der untersuchten Nuclei im Vergleich zu Kontrolltieren in eine mehr zentrale Position im Nucleus verschoben (Abb. 12c,d). Bei normal adulten und jungen Tieren liegt der Zellkörperstreifen dagegen immer etwas asymmetrisch, aus der Mitte nach medial verschoben, im Nucleus (Abb. 12a,b). Auch schien die Streuung der Zellkörper im dorso – ventralen Somastreifen qualitativ betrachtet bei der MSO von UCA-Tieren verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren etwas ausgeprägter zu sein.

Wie bereits aus den Übersichtsaufnahmen (Abb. 12c,d) hervorgeht, waren dagegen in der Verteilung der glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen von monaural aufwachsenden UCA-Tieren deutliche qualitative Unterschiede zu nicht operierten Tieren der gleichen Altersgruppe (adult) feststellbar. Im Gegensatz zu normal adulten Tieren (Abb. 12a), zeigten Glycinrezeptor – MAP2-Doppelfärbungen von ipsilateral (Abb. 12c) oder contralateral (Abb. 12d) zur Vertäubung gelegenen MSO-Nuclei positive Färbung

für postsynaptische Glycinrezeptoren (gelb) nicht nur an den Membranen der Somata sondern auch an weiten Teilen der Membranen medialer und lateraler Dendriten (blau). Das Verteilungsmuster der Glycinrezeptorfärbung bei der UCA-Gruppe entsprach daher eher dem bei jungen Tieren ohne Hörerfahrung (Abb. 12b) beobachteten. Allerdings schien in diesen niedrig vergrößerten Übersichtsabbildungen die positive Markierung für Glycinrezeptoren in der MSO junger Tiere (Abb. 12b), besonders an den Dendriten, qualitativ kräftiger zu sein als in der MSO von UCA-Tieren (Abb. 12c,d). Wie die qualitative (Abb. 15, 16) und quantitative (s.h. Kapitel 4.1.4) Analyse der Verteilung der Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes auf Einzelzellebene bei jungen und UCA-Tieren jedoch zeigte, war dies eher ein optischer Unterschied in der Färbungsintensität, denn ein Unterschied in der Verteilung glycinерger Synapsen. Diese höhere Färbungsintensität bei MSO-Neuronen junger Tiere dürfte vor allem auf die hier verwendete immunhistochemische Methode (s.h. Kapitel 3.1.2.2.1) zurückzuführen sein, wodurch die Zellmembranen junger Tiere möglicherweise stärker aufbrechen und sich so mehr Antikörper binden kann (s.h. Kapitel 5.1.1).

Betrachtet man die Verteilung der prä- und postsynaptischen Bestandteile glycinерger Synapsen in der UCA-Gruppe auf dem Niveau einzelner Zellen, so manifestieren sich die bereits bei der Übersichtsaufnahme erhobenen qualitativen Befunde. Wie die in Abb. 15e dargestellte Einzelzelle zeigt, war Färbung für präsynaptisches Glycin (rot) nicht nur am Soma der UCA-MSO-Zelle (gefüllter Pfeil), sondern auch auf den gesamten markierten Dendriten (blau, offene Pfeile) zu finden. Bis in die distalen Bereiche der Dendriten (Abb. 15e, ca. 100 – 120 µm vom Soma entfernt) waren die Membranen mit glycinergen Boutons besetzt. Auch in der Verteilung des postsynaptischen Ankerproteins Gephyrin (Abb. 15f) spiegelte sich diese gleichmäßige Verteilung der glycinergen Synapsen wieder. So waren positiv markierte Gephyrincluster (grün, Abb. 15f) sowohl an den Zellkörpern der MSO-Neurone (gefüllte Pfeile, Abb. 15f), als auch homogen verteilt im gesamten dendritischen Neuropil zu finden (offene Pfeile, Abb. 15f). Obwohl die Dendriten bei der Gephyrinfärbung nicht durch eine Doppelfärbung mit MAP2 markiert waren, konnten sie durch den dichten Besatz an Gephyrinclustern bei einigen UCA-Zellen als Kontur erkannt werden. Die in Abb. 15e (Glycin – MAP2) und Abb. 15f (Gephyrin) dargestellten MSO-Zellen liegen jeweils contralateral zur vertäubten Seite. Ipsilateral gelegene Zellen sind hier nicht abgebildet, zeigten aber eine identische Verteilung von markierten glycinergen Synapsen. Im Unterschied zu nicht operierten Kontrolltieren gleichen Alters (adult, Abb. 15a,b), war bei Tieren der UCA-Gruppe eine räumliche Beschränkung von Glycin und Gephyrin auf die Somaregion der Neurone nicht

festzustellen. Die Verteilung zeigte somit bei diesen monaural aufgewachsenen Tieren qualitativ das gleiche diffuse Muster wie es bei jungen Tieren ohne Hörerfahrung (Abb. 15c,d) zu beobachten war.

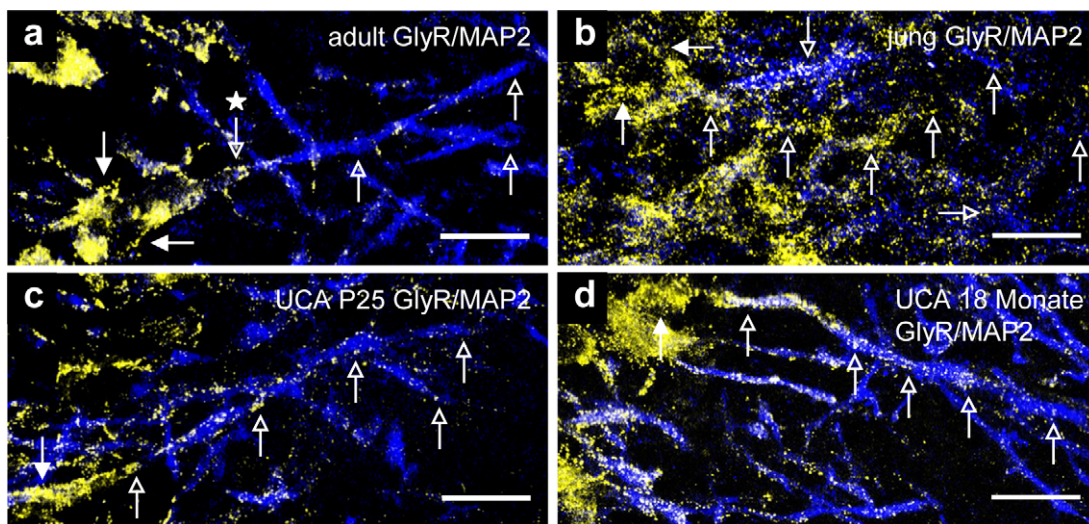


**Abbildung 15:** Verteilung von Glycin und Gephyrin auf MSO-Neuronen einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA)

Konfokale Aufnahmen fluoreszent markierter MSO-Neurone adulter (a,b), junger (c,d) und vor Hörbeginn einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA) (e,f). (a – d) Legende s.h. Abb. 13. (e) MSO-Zellen adulter UCA-Wüstenrennmäuse weisen nicht nur am Soma (gefüllter Pfeil) sondern auch auf den gesamten, MAP2 markierten Dendriten (blau, offene Pfeile) positive Färbung für Glycin (rot) auf. (f) Auch postsynaptisches Gephyrin (grün) liegt bei adulten UCA-Zellen sowohl am Soma (gefüllte Pfeile), als auch homogen verteilt im dendritischen Neuropil (offene Pfeile) vor. Im Gegensatz zu Kontrolltieren (a,b) ist keine räumliche Beschränkung der glycinergen Eingänge auf Somata und proximale Dendriten erkennbar, Glycin wie Gephyrin entsprechen damit in ihrer Verteilung dem bei jungen Tieren ohne Hörerfahrung (c,d) beobachteten Muster. Die Zellen in (e) und (f) liegen contralateral zur entfernten Cochlea  
Maßstab: 20 µm

Im Einklang mit der beobachteten homogenen Verteilung von Glycin und Gephyrin über Zellkörper und gesamte Dendriten, waren auch postsynaptische Glycinrezeptoren bei UCA-MSO-Neuronen in einer räumlich nicht geordneten Art und Weise arrangiert. Wie die doppelgefärbten (Glycinrezeptor – MAP2) Einzelzellen in Abb. 16c,d verdeutlichen, waren positiv markierte Glycinrezeptorcluster (gelb) nicht nur an den Zellkörpern (gefüllte Pfeile), sondern auch auf den gesamten sichtbaren Dendriten (blau, offene Pfeile) in hoher Dichte vorhanden. Im Gegensatz zu adulten Kontrolltieren (Abb. 16a) waren bei UCA-Neuronen gefärbte Glycinrezeptorcluster bis weit in distale Dendritenbereiche hinein zu finden (Abb. 16c,d; ca. 100 – 120 µm vom Soma entfernt). Die Verteilung von

Glycinrezeptoren entsprach damit ebenso wie schon die Verteilung von Glycin und Gephyrin qualitativ der bei jungen Tieren ohne Hörerfahrung beobachteten (Abb. 16b). Die Auswirkungen der einseitigen Cochleaentnahme auf die Verteilung der Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes waren dabei unabhängig von der Überlebenszeit der Tiere (15 Tage bis zu mehreren Monaten, Abb. 16c,d) oder der Lage der Neurone ipsilateral (Abb. 16c) oder contralateral (Abb. 16d) zur entnommenen Cochlea.



**Abbildung 16:** Verteilung von Glycinrezeptoren auf MSO-Neuronen einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA)

Konfokale Aufnahmen fluoreszent markierter MSO-Neurone adulter (a), junger (b) und vor Hörbeginn einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA) (c,d). **(a,b)** Legende s.h. Abb. 14. **(c,d)** Im Gegensatz zu adulten Kontrolltieren (a), sind postsynaptische Glycinrezeptoren (gelb) bei MSO-Neuronen adulter UCA-Tiere, sowohl an den Somata (gefüllte Pfeile), als auch an den gesamten, MAP2-positiven Dendriten (blau, offene Pfeile) in hoher Dichte feststellbar. Die Verteilung entspricht damit der bei jungen Tieren ohne Hörerfahrung (b) beobachteten. Das Verteilungsmuster der Glycinrezeptoren bei UCA-Wüstenrennmäusen ist dabei unabhängig von der postoperativen Überlebenszeit der Tiere (c, 15 Tage – 18 Monate, d) und der Lage der Neurone ipsi- (c) oder contralateral (d) zur entnommenen Cochlea. Maßstab: 20 µm

Die qualitativ festgestellte Verteilung von glycinergen Synapsen auf MSO-Zellen monaural vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA) unterschied sich damit grundlegend von der bei normal adulten Wüstenrennmäusen (adult). Wie bei Wüstenrennmäusen ohne Hörerfahrung (jung) verteilten sich die glycinergen Synapsen bei monauralen Tieren homogen über das Soma und die bipolaren Dendriten, im Gegensatz zur räumlichen Beschränkung glycinerner Synapsen auf die Somaregion bei adulten Tieren. Zur quantitativen Untersuchung der Verteilung glycinerner Synapsen an MSO-Neuronen der drei experimentellen Gruppen von Wüstenrennmäusen siehe Kapitel 4.1.4.

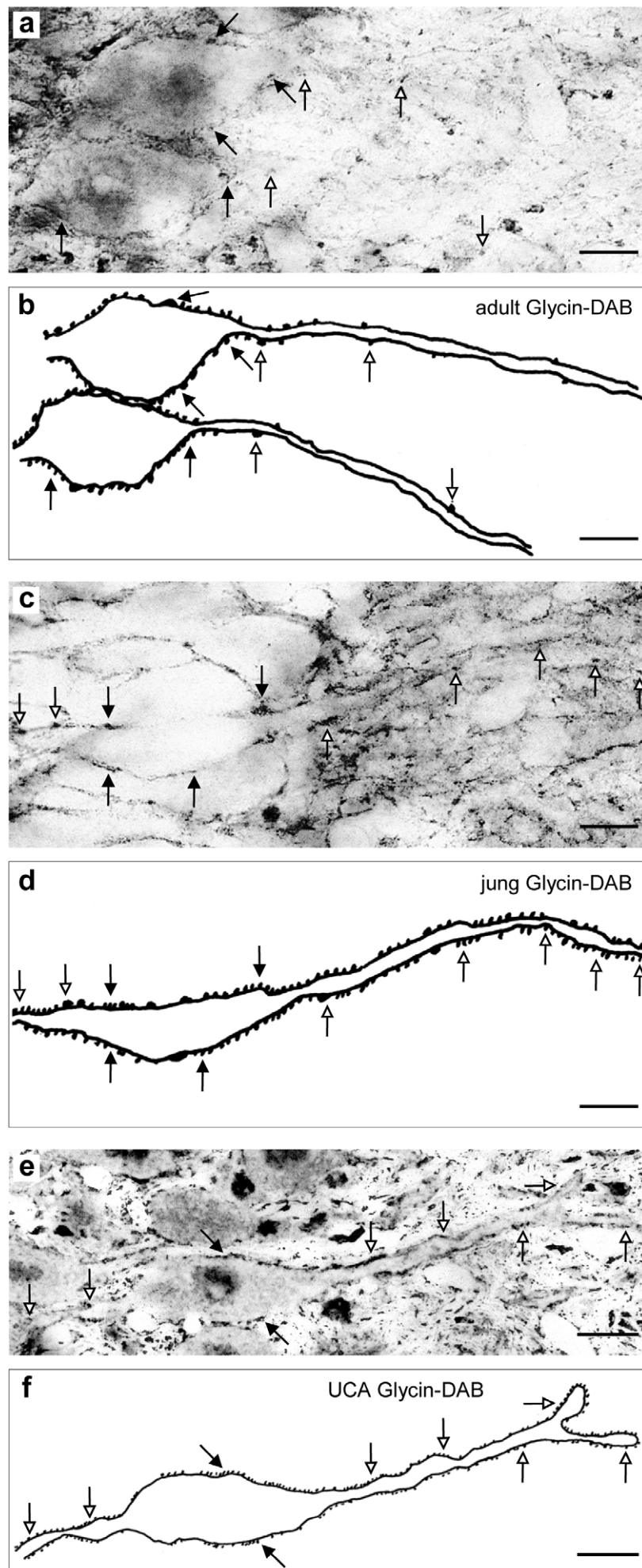
#### **4.1.4 Quantifizierung der Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen adulter, junger und unilateral vertäubter Wüstenrennmäuse**

Zur quantitativen Bestimmung der in den vorangegangenen Kapiteln (4.1.2; 4.1.3) qualitativ beschriebenen Anordnung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen der verschiedenen experimentellen Gruppen von Wüstenrennmäusen, wurde die Verteilung der drei immunhistochemisch untersuchten Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes mit verschiedenen Methoden analysiert.

##### **4.1.4.1 Quantifizierung der Verteilung von präsynaptischem Glycin**

Zur quantitativen Analyse der Verteilung präsynaptischer glycinерger Boutons wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Zur Bestimmung der Dichteverteilung glycinерger Boutons pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran an individuellen MSO-Neuronen wurden mit DAB als Chromogen markierte Hirnschnitte direkt am Lichtmikroskop analysiert. Zur eindeutigen Darstellung der analysierten MSO-Neurone wurden die Somata und die gesamten erkennbaren Dendriten mit Hilfe eines Zeichentubuses am Lichtmikroskop vom Hirnschnitt abgezeichnet (adult, jung, UCA; Details zur Methode s.h. Kapitel 3.1.4.1). Die in Abb. 17 dargestellten Aufnahmen und die korrespondierenden Zeichnungen zeigen Glycin – DAB gefärbte MSO-Einzelnzellen aus den verschiedenen experimentellen Gruppen wie sie Eingang in die Analyse fanden. Die mit dieser Methode gefärbten Einzelzellen zeigten dabei die gleiche qualitative Verteilung von präsynaptischem Glycin, wie sie bereits in fluoreszent markiertem Gewebe (Abb. 15a,c,e) festgestellt werden konnte. Bei adulten MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus (Abb. 17a,b) fanden sich markierte präsynaptische glycinерge Boutons (schwarz) auch hier nahezu ausschließlich am Soma (gefüllte Pfeile) und den extrem proximalen Dendriten, wogegen an distalen Dendriten nur sehr vereinzelt glycinерge Boutons erkennbar waren (offene Pfeile, Abb. 17a,b). Bei MSO-Einzelnzellen junger (Abb. 17c,d) und einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA, Abb. 17e,f) dagegen verteilten sich markierte glycinерge Boutons homogen über die Somata (gefüllte Pfeile) und die gesamten, sichtbaren Dendriten (offene Pfeile).





Als zweite Methode der Quantifizierung von präsynaptischem Glycin wurde die Dichte gefärbter Boutons pro 20 µm Zählabschnitt im Gesamtkernbereich des Nucleus in fluoreszent markiertem Gewebe bestimmt (adult, s.h. auch Kapitel 3.1.4.4). Die analysierten Dichtewerte wurden dabei entweder auf die Dichte pro µm Somamembran (Einzelzellen) oder auf die Dichte im Zellkörperabschnitt (Nucleus) normalisiert.

Wie die Analyse an individuellen Neuronen zeigte, nahm bei adulten Tieren die Dichte glycinерger Boutons auf den Dendriten mit zunehmender Entfernung vom Soma rapide ab (Abb. 18a, schwarze Kurve). Bereits auf den ersten 20 µm der proximalen Dendriten war die Punktdichte im Vergleich zum Zellkörper signifikant reduziert ( $p < 0,001$ ; MWU-Test). Schon über diese kurze Distanz verringerte sich die relative Punktdichte, bezogen auf die zum Wert eins normalisierte Dichte am Soma, um mehr als 50% (Abb. 18a). Mit zunehmendem Abstand vom Soma nahm die Dichte auf den Dendriten bis zu einer Distanz von 40 µm weiter signifikant ab ( $p < 0,001$ ; MWU-Test) und blieb danach im weiteren Verlauf der Mittelwertkurve in den distaleren Dendritenbereichen (50 – 100 µm) auf einem konstant niedrigen Niveau von ca. 15 – 18% des Somawertes.

Die unabhängig von der Verteilung auf einzelnen Neuronen durchgeführte Analyse der Verteilung glycinерger Boutons im Gesamtkernbereich der MSO bei adulten Wüstenrennmäusen (Abb. 18a, gestrichelte rote Kurve) zeigte einen praktisch identischen Verlauf der Mittelwertkurve.

---

**Abbildung 17:** Glycin-DAB markierte MSO-Einzelzellen adulter, junger und einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse zur quantitativen Analyse

Aufnahmen und entsprechende Zeichnungen von Glycin-DAB gefärbten MSO-Einzelzellen aus Hirnschnitten adulter (a,b), junger (c,d) und vor Hörbeginn einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA) (e,f). Obwohl die Dendriten bei dieser immunhistochemischen Färbungsmethode nicht spezifisch markiert wurden, konnten sie im Lichtmikroskop an Hand ihres Lichtbrechungsverhaltens (adult, jung, UCA) oder durch den dichten Besatz an glycinерgen Boutons (jung, UCA) als Kontur eindeutig abgegrenzt werden. **(a,b)** Bei adulten Tieren finden sich markierte glycinерge Boutons (schwarze Punkte) nahezu ausschließlich am Soma (gefüllte Pfeile) und den extrem proximalen Dendriten (offene Pfeile). In distalen Dendritenbereichen sind praktisch keine markierten Boutons erkennbar (offene Pfeile). **(c,d)** Bei MSO-Zellen junger Wüstenrennmäuse verteilen sich markierte glycinерge Boutons (schwarze Punkte) homogen über den Zellkörper (gefüllte Pfeile) und die gesamten sichtbaren Dendriten (offene Pfeile). **(e,f)** Glycinерge Boutons (schwarze Punkte) sind bei MSO-Zellen adulter UCA-Wüstenrennmäuse sowohl am Soma (gefüllte Pfeile), als auch an den gesamten erkennbaren Dendriten nachweisbar (offene Pfeile). Maßstab: 10 µm

---

Die beiden Kurven zeigten weder im Gesamtverlauf noch in den einzelnen, überlappenden dendritischen Zählabschnitten signifikante Unterschiede zueinander ( $p > 0,34$ ; MWU-Test). So war auch in dieser Analyse eine signifikante ( $p < 0,001$ ; MWU-Test) Reduzierung der Punktdichte relativ zum Soma innerhalb der ersten 20  $\mu\text{m}$  auf den proximalen Dendriten erkennbar. Die Reduktion der relativen Punktdichte innerhalb dieser Distanz, bezogen auf den normalisierten Somawert, war mit mehr als 60% zwar etwas größer als bei der Analyse von individuellen Neuronen ( $> 50\%$ ), der Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $p > 0,35$ ; MWU-Test). Im weiteren Verlauf zeigte die Mittelwertkurve ebenso einen weiteren signifikanten ( $p < 0,001$ ; MWU-Test) Abfall der Dichte bis zu einem Abstand von 40  $\mu\text{m}$  vom Soma, und näherte sich in weiter distal auf den Dendriten gelegenen Abschnitten einem Wert von ca. 10% des Somawerts an. Damit zeigten beide Methoden der Färbung und Quantifizierung gleiche Ergebnisse.

Im Gegensatz zu den Mittelwertkurven der Verteilung von glycinergen Boutons bei adulten Tieren, blieben die Kurven für junge (Abb. 18a, blaue Kurve) und unilateral vertäubte Tiere (Abb. 18a, grüne Kurve) auf einem relativ konstant hohen Niveau. Anders als bei adulten Tieren erhöhte sich bei diesen beiden Gruppen die relative Punktdichte im ersten Dendritenabschnitt (10  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) im Vergleich zum Soma sogar signifikant ( $p < 0,001$ ; MWU-Test) um 26% bei jungen Tieren bzw. um 35% in der UCA-Gruppe. Zwar zeigte in der Folge sowohl die Kurve für junge als auch für UCA-Tiere mit zunehmendem Abstand vom Soma eine leichte Abnahme der Punktdichte auf den Dendriten, diese Abnahme war jedoch im Vergleich zu adulten Tieren zum einen weitaus geringer und zum anderen war sie nicht kontinuierlich bis in die distaleren Dendritenbereiche. So nahm die relative Punktdichte bei jungen Tieren von proximalen zu distalen Dendritenabschnitten bis zu einer Distanz von 70  $\mu\text{m}$  zum Soma maximal um ca. 25% ab, erhöhte sich aber im Anschluss bis zum letzten gemessenen Wert (100  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) wieder auf das Niveau am Zellkörper. Die Mittelwertkurve für die UCA-Gruppe zeigte einen ähnlichen Verlauf wie die Kurve für junge Tiere, wenn auch auf einem generell etwas höheren Niveau. Nach dem bereits oben beschriebenen steilen Anstieg der relativen Punktdichte innerhalb der ersten 10  $\mu\text{m}$  auf den Dendriten auf 135% des Somawerts fiel die Dichte bei UCA-Tieren bis zu einem Abstand von 50  $\mu\text{m}$  wieder auf den Somawert, erreichte ein weiteres Maximum nach 80  $\mu\text{m}$  (128%) und fiel bis zu einer Distanz von 100  $\mu\text{m}$  wieder auf den Somawert ab. Da statistische Unterschiede zwischen ipsilateral und contralateral zur Vertäubung gelegenen Zellen nicht festgestellt werden konnten ( $p > 0,11$ ; nicht signifikant; MWU-Test) wurden beide zur UCA-Gruppe zusammengefasst.



Betrachtet man die Dichteverteilungen glycinerger Boutons in den drei Gruppen insgesamt, so unterschied sich die bei adulten Tieren festgestellte Verteilung jeweils signifikant von der Verteilung bei Tieren ohne Hörerfahrung (jung;  $p < 0,001$ ; MWU-Test) und unilateral vertäubten Tieren (UCA;  $p < 0,001$ ; MWU-Test). Die statistische Analyse zeigte trotz eines praktisch gleichen Verlaufs der Dichteverteilung auch zwischen jungen und unilateral vertäubten Tieren signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ; MWU-Test).

Die festgestellten Unterschiede in den Dichteverteilungen glycinerger Boutons bei den drei experimentellen Gruppen von Wüstenrennmäusen waren dabei unabhängig von möglichen Veränderungen in der dendritischen Verzweigung, da bei der vorliegenden Analyse die Dichte der Boutons pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran an individuellen Neuronen bestimmt wurde. Eine Beeinflussung der Ergebnisse der Analyse durch eine Zu- oder Abnahme der dendritischen Fläche und damit einhergehend der Zahl der Synapsen während der Entwicklung oder bedingt durch die unilaterale Cochleaentnahme konnte durch diese Art der Berechnung ausgeschlossen werden.

Aufgrund der Normalisierung der Werte zur Anzahl der Boutons pro  $\mu\text{m}$  Membran am Soma war es möglich, dass die Abnahme der Punktdichte auf den Dendriten bei adulten Tieren durch eine Proliferation der Synapsen am Zellkörper während der Entwicklung bedingt wird. Eine solche Proliferation wäre wegen der Normalisierung der Werte nicht zu erkennen und könnte damit, bei einer konstant gebliebenen Zahl von Synapsen auf den Dendriten, künstlich die relative Punktdichte auf den Dendriten herunterskalieren. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zusätzlich die absolute Zahl der glycinergen Boutons pro  $\mu\text{m}$  Somamembran (Abb. 18e) und der Umfang der MSO-Zellkörper (Abb. 18f) in DAB-gefärbtem Gewebe aus den drei experimentellen Gruppen bestimmt. In der gemittelten absoluten Dichte glycinerger Synapsen am Zellkörper zeigte sich beim Vergleich von adulten ( $0,30 \pm 0,02$  Punkta /  $\mu\text{m}$ ; Abb. 18e schwarzer Balken) und jungen Tieren ( $0,28 \pm 0,01$  Punkta /  $\mu\text{m}$ ; Abb. 18e schräggestreifter Balken) keine signifikante Veränderung ( $p > 0,98$ ; MWU-Test). Damit gab es auch keinen Hinweis für eine Proliferation glycinerger Synapsen am Zellkörper während der normalen Entwicklung der inhibitorischen Eingänge zur MSO. An MSO-Somata von Tieren der UCA-Gruppe ( $0,67 \pm 0,02$  Punkta /  $\mu\text{m}$ ; Abb. 18e weißer Balken) war dagegen eine signifikante Zunahme der Dichte von glycinergen Synapsen im Vergleich zu adulten und jungen Tieren feststellbar ( $p < 0,001$ ; MWU-Test). Der Zellkörperumfang und damit die Länge der Somamembran der MSO-Neurone (Abb. 18f) lag bei adulten und UCA-Tieren in einer ähnlichen, nicht signifikant ( $p > 0,06$ ; MWU-Test) zu unterscheidenden Größenordnung (adult:  $74,3 \pm 1,8$   $\mu\text{m}$ ; UCA:  $69,9 \pm 1,8$   $\mu\text{m}$ ). Im Vergleich mit den beiden anderen

Gruppen war der Umfang der Zellkörper bei den sich noch in der Entwicklung befindenden jungen Tieren erwartungsgemäß etwas geringer (jung:  $59,4 \pm 1,7 \mu\text{m}$ ), der Unterschied zu adulten und UCA-Tieren war dabei signifikant ( $p < 0,001$ ; MWU-Test).

Aus diesen Ergebnissen geht somit hervor, dass Veränderungen der Punktdichte am Soma nicht der beschriebenen Veränderung der Synapsenverteilung auf den Dendriten zugrunde liegen können.

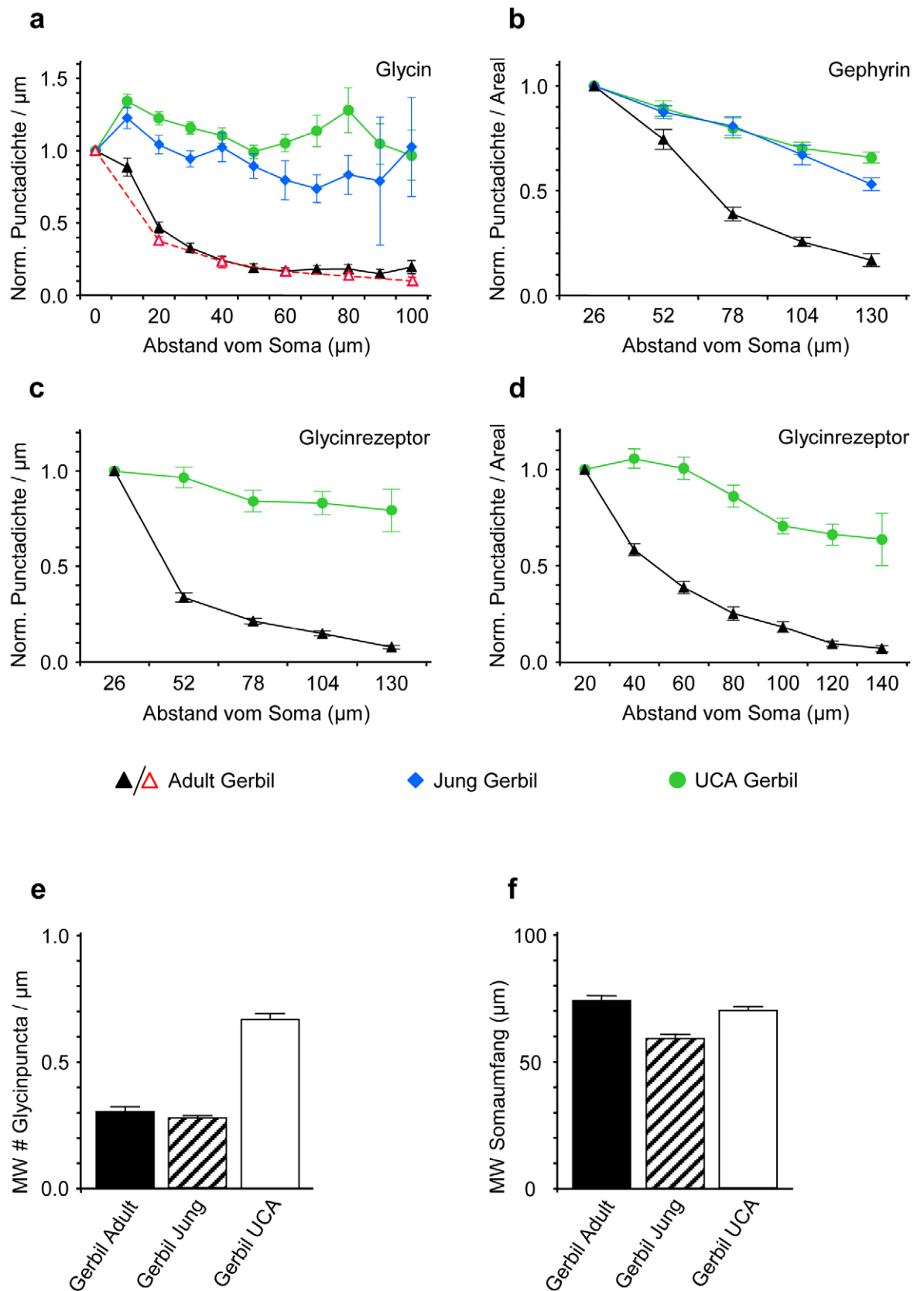
#### 4.1.4.2 Quantifizierung der Verteilung des postsynaptischen Ankerproteins Gephyrin

Die quantitative Analyse der Verteilung von postsynaptischen Gephyrinclustern in der gesamten MSO (Abb. 18b) bestätigte die für die Verteilung von glycinergen Boutons auf einzelnen Neuronen (Abb. 18a) festgestellten Ergebnisse. Bei dieser Analyse wurde eine relative Punktdichte pro Fläche in Zählfenstern bestimmt, die ausgehend von der Mitte des Somastreifens bis in die distalen Bereiche des medialen und lateralen Dendritenfeldes reichten. Die präsentierten Daten wurden auf den Wert im Zählfenster, welches den zentralen Somabereich abdeckt normalisiert (0 – 26  $\mu\text{m}$  Abstand von der Mitte des Somastreifens; s.h. auch Kapitel 3.1.4.3). Da bei der Analyse der Verteilungsdaten von Gephyrinpunkta innerhalb der experimentellen Gruppen von Wüstenrennmäusen (adult, jung, UCA) keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,1$ ; MWU-Test) zwischen den Zählfenstern des lateralen und medialen Dendritenraumes festgestellt werden konnten, wurden beide Dendritenräume zusammengefasst.

Wie aus Abb. 18b hervorgeht, war bei den MSO-Nuclei adulter Tiere (schwarze Kurve) eine hohe Dichte von Gephyrinclustern im Bereich der Zellkörper (0 – 26  $\mu\text{m}$ ) feststellbar. Ausgehend von diesem zentralen Somabereich zeigte die Mittelwertkurve anschließend eine starke Abnahme der relativen Punktdichte von proximalen zu distalen Abschnitten der Dendritenfelder. Schon im ersten, proximalen Zählabschnitt des Dendritenfeldes (26 – 52  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) verringerte sich die relative Punktdichte im Vergleich zum Somabereich in signifikantem Maße um mehr als 25% ( $p < 0,001$ ; MWU-Test). Mit zunehmender Entfernung vom Somabereich nahm die Punktdichte im Dendritenfeld weiter signifikant ab ( $p < 0,05$ ; MWU-Test) und erreichte im distalsten Zählabschnitt (104 – 130  $\mu\text{m}$  Abstand vom Soma) ein Minimum von 17% relativ zum Zellkörperabschnitt.

In deutlichem Gegensatz dazu zeigten die Mittelwertkurven für junge (Abb. 18b, blaue Kurve) und UCA-Tiere (Abb. 18b, grüne Kurve) eine weitaus gleichmäßigere Verteilung der Dichte von Gephyrinclustern innerhalb der MSO. In ihrem Verlauf waren

die Kurven bei beiden Gruppen dabei nahezu identisch. So zeigten beide Kurven nicht nur eine hohe Punktdichte im zentralen Somabereich, sondern auch in den Abschnitten des Dendritenfeldes blieb die Dichte auf einem annähernd gleichen, hohen Niveau.



Eine ähnlich markante Abnahme der Punktdichte wie sie bei adulten Tieren zu sehen war, konnte weder bei jungen noch bei UCA-Tieren festgestellt werden. Zwar nahm die Dichte auch in diesen beiden Gruppen mit zunehmendem Abstand von den Zellkörpern ab, bei jungen Tieren um ca. 47% und bei Tieren der UCA-Gruppe um ca. 36% innerhalb von 130  $\mu\text{m}$ , diese Abnahme war jedoch weit weniger ausgeprägt als bei adulten Tieren (83% in 130  $\mu\text{m}$ ).

Da innerhalb der UCA-Gruppe keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,88$ ; MWU-Test) zwischen ipsi- und contralateral zur Vertäubung gelegenen MSO-Nuclei festzustellen waren, wurden beide Teilgruppen zur UCA-Gruppe zusammengefasst.

Die statistische Analyse der Dichteverteilungen von Gephyrinclustern in den drei Gruppen insgesamt, bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse. So war die bei adulten Tieren festgestellte Verteilung jeweils signifikant von der Verteilung bei jungen ( $p < 0,001$ ; MWU-Test) und unilateral vertäubten Tieren (UCA;  $p < 0,001$ ; MWU-Test) verschieden. Zwischen jungen und UCA-Tieren ließen sich dagegen keine signifikanten Unterschiede feststellen ( $p > 0,43$ ; MWU-Test).

---

### **Abbildung 18:** Quantifizierung der räumlichen Verteilung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus

**(a)** Bei adulten Wüstenrennmäusen nimmt die relative Dichte präsynaptischer, glycinерger Boutons sowohl gemessen pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran auf individuellen Neuronen (schwarzer Graph), als auch gemessen pro Fläche im Gesamtkernbereich der MSO (gestrichelter roter Graph) bereits innerhalb der ersten 20  $\mu\text{m}$  auf den Dendriten signifikant ab und verbleibt im weiteren Verlauf der Dendriten in einem Bereich sehr niedriger Werte. Bei jungen (blauer Graph) und UCA-Wüstenrennmäusen (grüner Graph) zeigt die pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran an individuellen Neuronen gemessene relative Dichte glycinерger Boutons mit zunehmendem Abstand vom Soma keine solche Abnahme, bis in distale Dendritenabschnitte verharrt die Dichte auf hohem Niveau. **(b)** Die relative Dichte (pro Fläche) postsynaptischer Gephyrincluster im dendritischen Neuropil nimmt bei adulten Wüstenrennmäusen (schwarzer Graph) mit zunehmendem Abstand zum Soma signifikant ab. Bei jungen (blauer Graph) und UCA-Tieren (grüner Graph) liegen die Mittelwertkurven der relativen Dichte über die gesamte analysierte Breite des Dendritenfeldes auf einer deutlich höheren Ebene. **(c,d)** Bei adulten Wüstenrennmäusen (schwarze Graphen) nimmt sowohl die pro  $\mu\text{m}$  Dendritenmembran an individuellen Neuronen (c), als auch die pro Fläche im Gesamtkernbereich der MSO (d) bestimmte relative Dichte postsynaptischer Glycinrezeptoren nach dem ersten Dendritenabschnitt signifikant ab. Unabhängig von der Art der Analyse zeigen die Verteilungen der relativen Dichte von Glycinrezeptoren bei UCA-Tieren (grüne Graphen) keine solche Abnahme auf den Dendriten, sie liegen bis in distale Bereiche auf hohem Niveau. **(e)** Die gemittelte absolute Dichte glycinерger Boutons am Soma zeigt keinen Unterschied zwischen adulten (schwarzer Balken) und jungen Wüstenrennmäusen (schräggestreifter Balken), bei UCA-Tieren (weißer Balken) ist der Dichtewert signifikant erhöht. **(f)** Im mittleren Umfang ihrer Zellkörper sind adulte und UCA-Wüstenrennmäuse nicht signifikant zu unterscheiden, junge Tiere zeigen einen nur wenig geringeren Somaumfang.

Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts (SEM)

---

#### 4.1.4.3 Quantifizierung der Verteilung von postsynaptischen Glycinrezeptoren

Die quantitative Verteilung von postsynaptischen Glycinrezeptorclustern wurde sowohl als Dichte pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran an individuellen MSO-Neuronen (Abb. 18c; s.h. auch Kapitel 3.1.4.2), als auch als Dichte pro  $20\ \mu\text{m}$  Zählfenster über den Gesamtkernbereich des Nucleus bestimmt (Abb. 18d; s.h. auch Kapitel 3.1.4.5). Die in den Abb. 18c und 18d dargestellten Mittelwertverteilungen der Dichte sind zur besseren Vergleichbarkeit der Daten ebenfalls in normalisierter Form dargestellt. Allerdings wurden die Werte bei der Analyse der Glycinrezeptoren nicht wie bei den beiden vorher dargestellten Analysen (Glycin und Gephyrin) auf den Wert am Soma normalisiert. Bei den hier ausgewerteten, fluoreszent markierten (Glycinrezeptor – MAP2) Hirnschnitten war es aufgrund der sehr hohen Färbungsdichte und Intensität an den Zellkörpern einerseits nicht möglich, einzelne membrangebundene Rezeptorcluster optisch gut zu trennen, andererseits konnte auch zwischen postsynaptischen und intrazellulär vorliegenden Glycinrezeptorclustern nicht mit hoher Sicherheit unterschieden werden (s.h. Kapitel 3.1.4.2; 3.1.4.5). Aufgrund dieser Unsicherheiten bezüglich der tatsächlichen Anzahl an membrangebundenen Rezeptorclustern wurde auf eine quantitative Analyse der Verteilung an den Zellkörpern verzichtet. Die Dichtewerte wurden daher bei der Analyse von individuellen Neuronen auf die Dichte pro  $\mu\text{m}$  im ersten, unmittelbar ans Soma angrenzenden, Dendritenabschnitt normalisiert (Abb. 18c; s.h. Kapitel 3.1.4.2). In diesem ersten Dendritenabschnitt konnten die Glycinrezeptorcluster optisch klar getrennt werden. Bei der Analyse der Verteilung im Gesamtkernbereich der MSO wurden die Werte auf die Dichte pro Fläche im ersten, proximalsten, dendritischen Zählfenster normalisiert (Abb. 18d; s.h. Kapitel 3.1.4.5). Da bei der Analyse der Verteilung von Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO weder bei adulten Tieren noch in der UCA-Gruppe signifikante Unterschiede ( $p > 0,15$ ; MWU-Test) zwischen Zählabschnitten aus dem lateralen und medialen Dendritenraum festgestellt werden konnten, wurden beide Dendritenräume zusammengefasst.

In Übereinstimmung mit der quantitativen Analyse der Verteilung von Glycin und Gephyrin, zeigte auch die Analyse von Glycinrezeptorclustern an einzelnen Neuronen bei adulten Tieren eine markante Abnahme der Punktdichte auf den Dendriten mit zunehmender Entfernung vom Soma (Abb. 18c, schwarze Kurve). Bezogen auf den ersten Dendritenabschnitt ( $0 - 26\ \mu\text{m}$  Abstand zum Soma) war die Punktdichte bereits bei einer Distanz von  $52\ \mu\text{m}$  zum Zellkörper signifikant reduziert ( $p < 0,001$ ; MWU-Test). Schon innerhalb dieser Distanz verringerte sich die relative Punktdichte um mehr als 66% (Abb.

18c). Bis zu mehr distal gelegenen Dendritenabschnitten (78 – 130  $\mu\text{m}$ ) nahm die Mittelwertkurve der relativen Punktdichte weiter signifikant ( $p < 0,003$ ; MWU-Test) ab und erreichte im letzten analysierten Abschnitt (104 – 130  $\mu\text{m}$  Abstand) ein Minimum von 8% relativ zum proximalsten Dendritenabschnitt. Allerdings war die Steilheit der Abnahme innerhalb dieser mehr distalen Dendritenabschnitte verglichen mit dem Übergang vom ersten zum zweiten Dendritenabschnitt nicht mehr so stark ausgeprägt.

Im Gegensatz zum Verlauf der Mittelwertkurve bei adulten Tieren, zeigte die Verteilung der relativen Dichte von Glycinrezeptorclustern pro  $\mu\text{m}$  Dendrit bei MSO-Einzelnzellen von monaural aufwachsenden Tieren einen nahezu gleichförmigen Verlauf (Abb. 18c, UCA, grüne Kurve). Anders als bei adulten Tieren blieb bei UCA-Tieren die relative Dichte der Cluster beim Übergang vom ersten (0 – 26  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) zum zweiten Dendritenabschnitt (26 – 52  $\mu\text{m}$  Abstand) auf einem annähernd gleichen, hohen Niveau. Der Rückgang der relativen Dichte nach 52  $\mu\text{m}$  auf den Dendriten war dabei mit nur ca. 3% (relativ zum ersten Abschnitt) äußerst gering, zudem waren beide Abschnitte statistisch nicht signifikant zu unterscheiden ( $p > 0,07$ ; MWU-Test). Im weiteren Verlauf lag die Mittelwertkurve bis zum äußerst distal gelegenen Dendritenabschnitt (104 – 130  $\mu\text{m}$  Abstand) weiter sehr deutlich oberhalb der Kurve für adulte Tiere (Abb. 18c, schwarze Kurve). Zwar war auch bei UCA-Tieren eine leichte Abnahme der relativen Punktdichte innerhalb der analysierten 130  $\mu\text{m}$  auf den Dendriten festzustellen (20% relativ zum ersten Abschnitt), diese Reduktion war jedoch verglichen mit der 92%igen Abnahme der Dichte über diese Distanz bei adulten Tieren weitaus geringer.

Innerhalb der UCA-Gruppe wurde nicht zwischen ipsi- und contralateral zur Vertäubung gelegenen Zellen unterschieden, da keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen feststellbar waren ( $p > 0,07$ ; MWU-Test).

Die unabhängig von der Verteilung auf einzelnen Neuronen durchgeführte Analyse der Verteilung von Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO (Abb. 18d) bestätigte die oben dargestellten Ergebnisse der Analyse einzelner Neurone. Bei MSO-Nuclei von adulten Tieren zeigte sich auch hier eine markante Reduzierung der relativen Punktdichte auf den Dendriten mit zunehmender Entfernung vom Soma (Abb. 18d, schwarze Kurve). Die Mittelwertkurve fiel ebenfalls schon im zweiten dendritischen Zählfenster (20 – 40  $\mu\text{m}$  Abstand zu den Zellkörpern) relativ zum proximalsten Zählfenster (0 – 20  $\mu\text{m}$  Abstand) signifikant ab ( $p < 0,001$ ; MWU-Test), die relative Punktdichte verringerte sich innerhalb dieser 20  $\mu\text{m}$  bereits um mehr als 42%. Von diesen proximal zu weiter distal im Dendritenfeld gelegenen Zählfenstern nahm die Mittelwertkurve der

Punktadichte kontinuierlich weiter ab. Bis zum distalsten Zählfenster (120 – 140  $\mu\text{m}$  Abstand) reduzierte sich die Dichte um 93% auf ein Minimum von 7% relativ zum ersten Zählfenster der Dendriten.

Bei der Analyse der Verteilung der Glycinrezeptoren im Gesamtkernbereich der MSO zeigte die Mittelwertkurve der UCA-Gruppe (Abb. 18d, grüne Kurve) einen mit der Kurve der Einzelzellanalyse (Abb. 18c, grüne Kurve) übereinstimmenden Verlauf. Die relative Punktadichte lag bei UCA-Tieren in allen dendritischen Zählabschnitten deutlich höher als bei adulten Tieren. Noch im dritten dendritischen Zählfenster (40 – 60  $\mu\text{m}$  Abstand zu den Zellkörpern) lag die relative Punktadichte dabei, bezogen auf den ersten Dendritenabschnitt, unverändert auf einem Niveau von 100%. Zu weiter distal im Dendritenfeld gelegenen Zählfenstern reduzierte sich zwar auch hier die relative Punktadichte, bis zu einer Distanz von 140  $\mu\text{m}$  um ca. 36%, jedoch war diese Abnahme im Vergleich zu adulten Tieren deutlich geringer.

Da auch bei dieser Analyse innerhalb der UCA-Gruppe keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,38$ ; MWU-Test) zwischen ipsi- und contralateral zur Vertäubung gelegenen MSO-Nuclei festzustellen waren, wurden beide Teilgruppen zur UCA-Gruppe zusammengefasst.

Der statistische Vergleich der Dichteverteilung von Glycinrezeptorclustern in den beiden experimentellen Gruppen insgesamt, zeigte sowohl bei der Analyse von Einzelzellen als auch bei der Analyse im Gesamtkernbereich der MSO einen hochsignifikanten Unterschied zwischen der bei adulten und der bei unilateral vertäubten Tieren beobachteten Verteilung ( $p < 0,001$ ; MWU-Test).

Die Quantifizierung der Verteilung von präsynaptischen glycinergen Boutons, postsynaptischen Gephyrinclustern und postsynaptischen Glycinrezeptorclustern an MSO-Neuronen von Wüstenrennmäusen bestätigte deutlich die Aussagen der qualitativen Analyse (s.h. Kapitel 4.1.2 – 3). Die räumlich beschränkte Anordnung der drei untersuchten Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes bei normal adulten Tieren unterschied sich dabei statistisch signifikant von der homogenen Verteilung wie sie Tiere ohne Hörerfahrung (jung) und monaural aufwachsende Tiere (UCA) zeigten.

## 4.1.5 Immun – Elektronenmikroskopische Untersuchung der MSO der Wüstenrennmaus

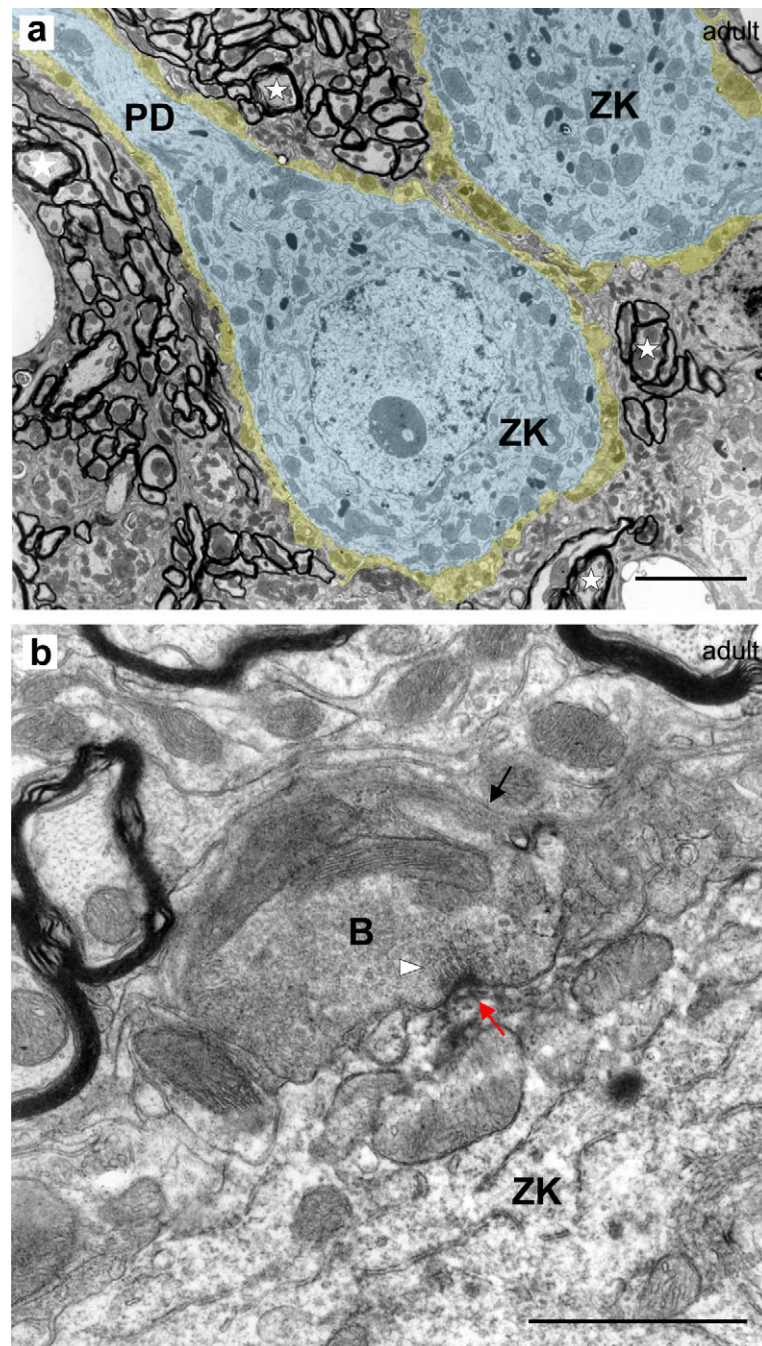
Die qualitativen Aussagen zur Ultrastruktur und Verteilung glycinерger Synapsen basieren auf der Analyse von insgesamt ca. 200 Ultradünnschnitten der beiden MSO-Nuclei von einer adulten und zwei jungen Wüstenrennmäusen. Dabei wurden im EM unter Verwendung verschiedener Vergrößerungsstufen hunderte von MSO-Somata und Dendriten untersucht.

### 4.1.5.1 Ultrastruktur der MSO bei adulten und jungen Wüstenrennmäusen

Die qualitative Untersuchung der Ultrastruktur der glycinergen Eingänge mittels Elektronenmikroskopie (EM) bei jungen und adulten Wüstenrennmäusen bestätigte die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Analyse. Bei niedriger Vergrößerung war die typische Struktur der MSO zu erkennen. Die Übersichtsaufnahme eines coronalen Stammhirnschnittes einer adulten Wüstenrennmaus in Abb. 19a zeigt zwei parallel angeordnete MSO-Zellen (blau), in beiden Fällen ist der Zellkörper (ZK) zu erkennen, sowie bei der unteren Zelle der unmittelbare Beginn des proximalen Dendritens (PD). Präsynaptische Endigungen (gelb) umgeben in kontinuierlicher Verteilung die gesamte Membranfläche der beiden MSO-Neurone. Auch die Dendriten waren mit dichten, nahezu ununterbrochenen Reihen von synaptischen Terminalen besetzt (Abb. 22b). Auffällig waren desweiteren massive Bündel von myelinisierten Axonen (Sterne, Abb. 19a), die weite Teile des extrazellulären Raumes zwischen den MSO-Neuronen ausfüllten. Als weitere Besonderheit waren zudem praktisch alle präsynaptischen Boutons an Somata und Dendriten von prominenten, oftmals mehrlagigen, Gliazellfortsätzen umhüllt (schwarze Pfeile, Abb. 19b, 22a,b). Bei diesen Fortsätzen handelte es sich höchstwahrscheinlich um Astrocytenlamellen. Wie in Abb. 22b zu sehen, sendet ein Astrocyt (gelbe Raute) dünne Gliafilamente aus, die ein benachbartes präsynaptisches Terminal umschließen.

Bei höherer Vergrößerung waren die, durch PE-Immunhistochemie markierten Gephyrincluster an den elektronendichten und daher schwarz erscheinenden DAB-Ablagerungen zu erkennen (rote Pfeile, Abb. 19b, 20a, 22a). Diese so markierten Gephyrincluster waren immer an der postsynaptischen Membran der Zellen lokalisiert und in allen Fällen colokalisiert mit einem präsynaptischen Terminal. Sie waren in allen Fällen Bestandteil einer komplett als solche zu identifizierenden Synapse. In Abb. 19b ist ein Beispiel für eine so identifizierte inhibitorische glycinerge Synapse am Zellkörper (ZK) einer MSO-Zelle der adulten Wüstenrennmaus zu sehen.

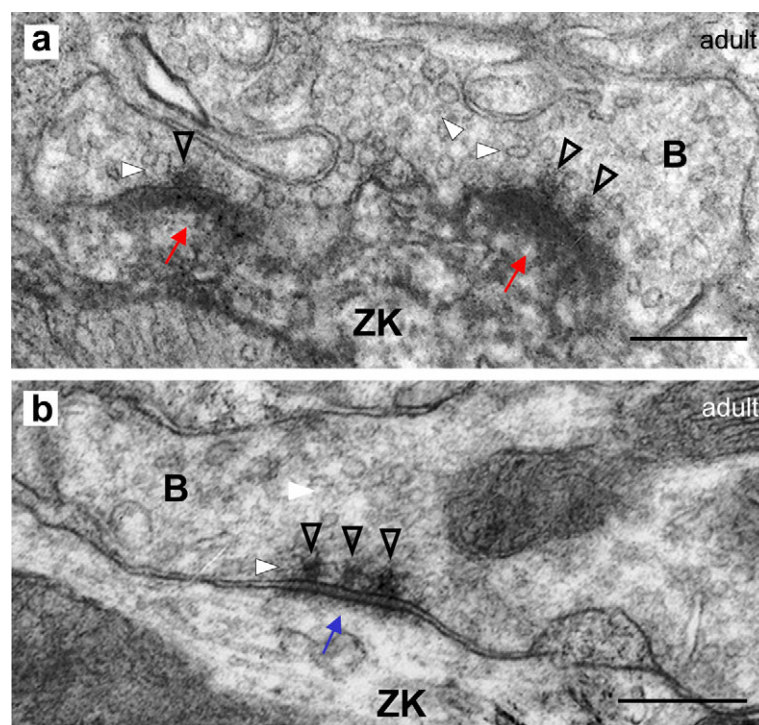




**Abbildung 19:** Ultrastruktur der MSO in der adulten Wüstenrennmaus

**(a)** Niedrig vergrößerte EM-Aufnahme der MSO einer adulten Wüstenrennmaus mit zwei parallel angeordneten PC-Zellen (blau). Erkennbar sind die beiden Zellkörper (ZK) und in einer Zelle der Ursprung des proximalen Dendriten (PD). Dichte Reihen präsynaptischer Endigungen (gelb) umgeben die Membranen beider Zellen. Dicht gepackte Bündel stark myelinisierter Axone (Sterne) füllen nahezu den gesamten extrazellulären Raum zwischen den Neuronen. **(b)** EM-Aufnahme einer einzelnen inhibitorischen Synapse am Zellkörper (ZK) einer MSO-Zelle der adulten Wüstenrennmaus. Zu erkennen ist ein von mehrlagigen Astrocytenlamellen (schwarzer Pfeil) umschlossener präsynaptischer Bouton (B) mit einer elektronendichten aktiven Zone (schwarz), an die, perlschnurartig aufgereiht, flache synaptische Vesikel angedockt sind (weiße Pfeilspitze). Colokalisiert dazu liegt unterhalb des synaptischen Spalts an der elektronendichten postsynaptischen Membran ein durch DAB-Ablagerung elektronendicht markiertes Gephyrincluster (schwarz, roter Pfeil). Maßstab: 5  $\mu\text{m}$  in (a), 1  $\mu\text{m}$  in (b)

Das Gephyrincluster (positive Markierung, roter Pfeil, Abb. 19b) liegt direkt an der elektronendichten postsynaptischen Membran, unterhalb des synaptischen Spalts. Gegenüberliegend ist die elektronendichte präsynaptische Membran und das dazugehörige präsynaptische Terminal (B, Abb. 19b) zu erkennen. Im präsynaptischen Terminal ist der Ort der Transmitterausschüttung, die sog. aktive Zone, als eine Spezialisierung der präsynaptischen Membran an der Lage der elektronendichten präsynaptischen Membran sowie synaptischer Vesikel (weiße Pfeilspitze, Abb. 19b) die dort lokalisiert sind, zu erkennen. Die Anzahl der aktiven Zonen pro Terminal war relativ variabel. Unabhängig vom Typ der Synapse (exzitatorisch oder inhibitorisch) waren eine bis mehrere (bis zu 4) aktive Zonen pro Terminal zu beobachten.



**Abbildung 20:** Präsynaptische Spezialisierungen an inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen zu MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus

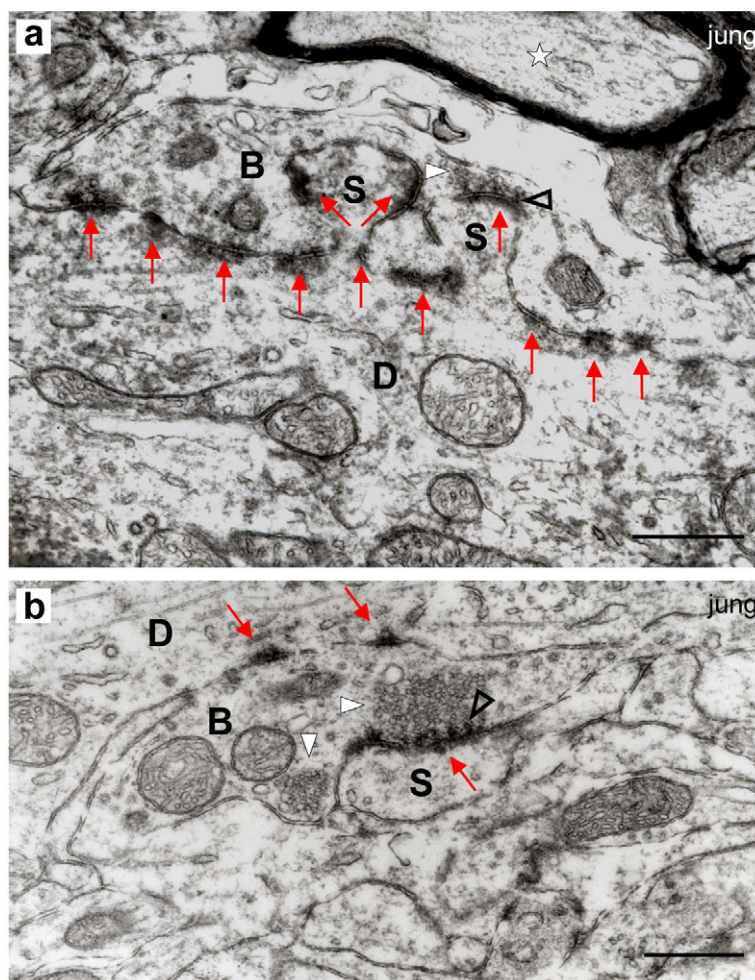
**(a)** Hochvergrößerte EM-Aufnahme identifizierter inhibitorischer Synapsen am Zellkörper (ZK) einer adulten MSO-Zelle. Das DAB-Reaktionsprodukt der Färbung gegen postsynaptisches Gephyrin liegt als wolkiger, elektronendichter Niederschlag unterhalb des synaptischen Spalts und der elektronendichten postsynaptischen Membran (rote Pfeile). Im präsynaptischen Terminal (B) sind an beiden aktiven Zonen die präsynaptischen Spezialisierungen („dense projections“, DP) als kleine, längliche, elektronendichte Fortsätze zu erkennen (offene Pfeilspitzen). Pleomorphe synaptische Vesikel (weiße Pfeilspitzen) sind z.T. an die DPs angelagert oder liegen als Vesikelpool im Terminal vor. **(b)** EM-Aufnahme einer nicht markierten (exzitatorischen) Synapse am Zellkörper (ZK) einer adulten MSO-Zelle. Unterhalb des synaptischen Spalts liegt kein DAB-Reaktionsprodukt vor, als einzig elektronendichte Struktur ist die postsynaptische Membran zu erkennen (blauer Pfeil). Im präsynaptischen Terminal (B) der wahrscheinlich exzitatorischen Synapse zeigt die aktive Zone ebenfalls drei DPs (offene Pfeilspitzen), an die runde synaptische Vesikel angelagert sind (weiße Pfeilspitzen). Maßstab: 250 nm

Bei nahezu allen untersuchten Synapsen waren einige synaptische Vesikel direkt an der aktiven Zone angelagert. Wie auch in den dargestellten Beispielen zu erkennen, zeigte sich dabei oftmals als besondere Auffälligkeit eine perlschnurartige Reihung der synaptischen Vesikel (Abb. 19b, 22a). Die Form der synaptischen Vesikel an Gephyrin-positiven Synapsen war nicht immer eindeutig zu bestimmen. Soweit erkennbar, waren die synaptischen Vesikel meist flach und länglich (weiße Pfeilspitzen, Abb. 19b, 20a, 22a) oder es lag ein Gemisch von verschiedenen Vesikeltypen in einem Terminal vor. Bei diesem sog. pleomorphen Typ von Bouton (Brunso-Bechtold et al. 1990) fand sich eine große Auswahl von Formen, die neben typisch flachen auch eher ovale und runde Vesikel einschloss (weiße Pfeilspitzen, Abb. 20a). Sowohl bei einer Reihe von markierten inhibitorischen, als auch bei nicht markierten und daher höchstwahrscheinlich exzitatorischen Synapsen zeigte sich eine weitere strukturelle Auffälligkeit der aktiven Zone. Wie Abb. 20 zeigt waren bei einigen aktiven Zonen kleine, längliche, elektronendichte Fortsätze zu erkennen, die sich senkrecht zur Membran in Richtung des Terminals erstrecken („dense projections“, DPs, offene Pfeilspitzen, Abb. 20, 22). An diesen präsynaptischen Spezialisierungen waren in den meisten Fällen auch synaptische Vesikel angelagert (weiße Pfeilspitzen, Abb. 20, 22).

Die Ultrastruktur der MSO bei jungen Wüstenrennmäusen war im allgemeinen vergleichbar zu der bei adulten Tieren. Es war allerdings an der Anatomie einiger Strukturen zu erkennen, dass diese jungen Tiere sich noch in der Entwicklung befinden und noch nicht die gleiche Entwicklungsstufe wie adulte Tiere erreicht haben. So war beispielsweise der Grad der Myelinisierung der Axone deutlich geringer, desweiteren waren sehr viel weniger Astrocytenlamellen zu erkennen. Eine weitere Besonderheit an den Zellen junger Tiere war das häufige Auftreten von dendritischen Dornen („spines“, S, Abb. 21, 22d). In den meisten Fällen waren an diesen Dornen markierte postsynaptische Gephyrincluster zu finden (rote Pfeile, Abb. 21, 22d). Neben klassischen, dendritischen Dornen waren an einigen Zellen Dorn-ähnliche Evaginationen der Somamembran zu finden (geschwungener Pfeil, Abb. 22c). An diesen somatischen Dornen konnten sowohl markierte, inhibitorische als auch nicht markierte, exzitatorische Synapsen lokalisiert werden (Abb. 22c). Im Unterschied zu jungen Tieren, waren diese dendritischen Dornen bei MSO-Neuronen adulter Wüstenrennmäuse äußerst selten. Lediglich an einem Dendriten konnte im adulten Tier ein Dorn mit einer nicht markierten, erregenden Synapse festgestellt werden. Wie bei der adulten Wüstenrennmaus, so waren auch bei jungen Wüstenrennmäusen die markierten Gephyrincluster immer Bestandteil einer morphologisch identifizierbaren Synapse (Abb. 21, 22c,d). Colokalisiert zu einer aktiven



Zone waren an den glycinergen Synapsen auf der postsynaptischen Seite markierte Gephyrincluster erkennbar (rote Pfeile, Abb. 21, 22c,d). So zeigen die in Abb. 21a,b dargestellten präsynaptischen Terminalien (B) mehrere aktive Zonen, die zum einen mit einem Dendriten (D) und zum anderen mit einem dendritischen Dorn (S) Synapsen bildeten. Die synaptischen Vesikel waren, analog zu den Synapsen im adulten Tier, auch bei Synapsen junger Wüstenrennmäuse häufig an der aktiven Zone angelagert und z.T. perlschnurartig aufgereiht (weiße Pfeilspitzen, Abb. 19, 21, 22c,d).



**Abbildung 21:** Ultrastruktur funktioneller inhibitorischer Synapsen an MSO-Neuronen junger Wüstenrennmäuse

**(a,b)** Durch Gephyrinfärbung markierte inhibitorische Synapsen (rote Pfeile) an Dendriten (D) und dendritischen Dornen (S) junger MSO-Zellen zeigen in ihrer Ultrastruktur alle anatomischen Merkmale funktioneller Synapsen. Die präsynaptischen Terminalien (B) weisen mehrere elektronendichte aktive Zonen auf, die z.T. DP's tragen (offene Pfeilspitzen). Pleomorphe synaptische Vesikel sind teilweise an die aktiven Zonen angelagert oder liegen als Vesikelpool im Terminal vor (weiße Pfeilspitzen). Colokalisiert zu den aktiven Zonen sind unterhalb des synaptischen Spalts und der elektronendichten postsynaptischen Membran markierte Gephyrincluster als elektronendichter Niederschlag (DAB) zu erkennen (rote Pfeile). Bei jungen Wüstenrennmäusen sind die Axone nur sehr wenig myelinisiert (a, Stern) und Astrocytenlamellen an präsynaptischen Boutons (B) kommen praktisch nicht vor. Maßstab: 500 nm

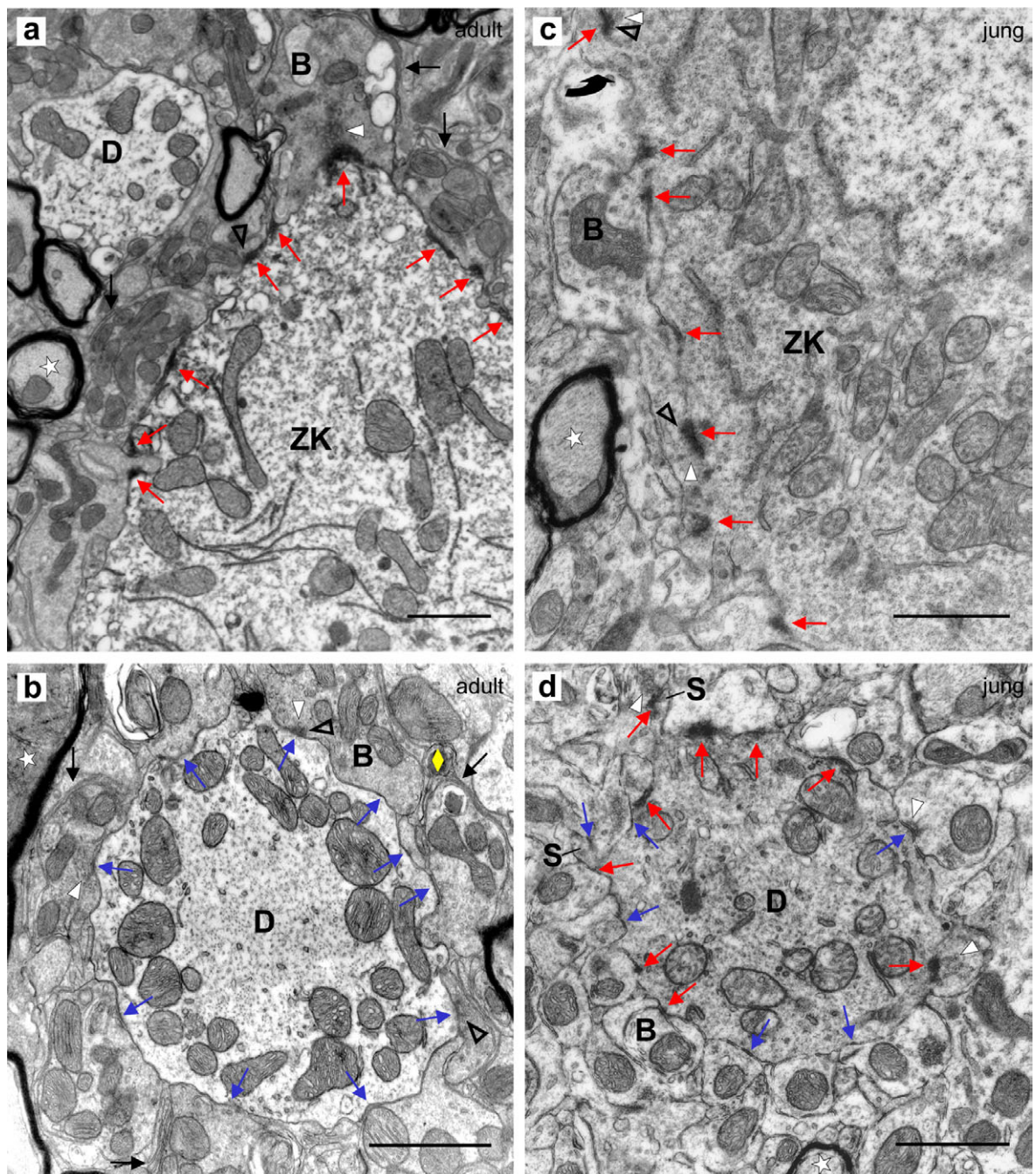
Daneben fanden sich manchmal auch Ansammlungen von Vesikeln die nicht unmittelbar einer aktiven Zone zugeordnet werden konnten (weiße Pfeilspitze, Abb. 21b). Auch die bereits erwähnten präsynaptischen Spezialisierungen (DPs) waren an einer Vielzahl von aktiven Zonen zu erkennen (offene Pfeilspitzen, Abb. 21, 22c). Aus diesen Befunden geht hervor, dass auch die Synapsen bei jungen Wüstenrennmäusen alle morphologischen Merkmale einer funktionellen Synapse erkennen lassen.

#### 4.1.5.2 Verteilung von elektronenmikroskopisch identifizierten, inhibitorischen Synapsen an MSO-Neuronen der adulten und jungen Wüstenrennmaus

Die qualitative EM-Analyse der Verteilung inhibitorischer Eingänge zu MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus auf dem Niveau der einzelnen Synapse bestätigte die, durch die lichtmikroskopische Auswertung erworbenen Befunde. Auch im EM zeigte sich die räumliche Beschränkung der inhibitorischen Eingänge auf die Somaregion der MSO-Neurone. An Zellkörpern lagen in hoher Dichte markierte postsynaptische Gephyrincluster vor (rote Pfeile, Abb. 22a). Zusammen mit den dazugehörigen präsynaptischen Terminalien zeigte dies eine Konzentration der inhibitorischen glycinergen Synapsen am Soma. An den Dendriten dagegen waren praktisch keine positiv gefärbten Gephyrincluster und daher auch keine inhibitorischen Synapsen zu erkennen. Wie das Beispiel eines quergeschnittenen Dendritens in Abb. 22b zeigt, waren keine gefärbten postsynaptischen Bereiche am Dendriten zu sehen, alle erkennbaren Synapsen sind daher vermutlich exzitatorische Synapsen (blaue Pfeile, Abb. 22b).

Ebenso wie die lichtmikroskopische Analyse, so zeigte auch die Untersuchung auf Ebene der Ultrastruktur qualitativ eine räumlich nicht geordnete Verteilung der glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen der jungen Wüstenrennmaus. Sowohl an den Zellkörpern (Abb. 22c), als auch an den Dendriten (Abb. 22d) war eine Vielzahl von markierten postsynaptischen Gephyrinclustern zu finden. Wie die Aufnahme eines Ausschnitts der Zellkörpermembran einer jungen MSO-Zelle (Abb. 22c) zeigt, waren an den Zellkörpern eine Vielzahl von markierten, postsynaptischen Gephyrinclustern und somit inhibitorischen Synapsen zu erkennen (rote Pfeile, Abb. 22c). Das ultrastrukturelle Verteilungsmuster der Gephyrincluster zeigte damit am Zellkörper keinen qualitativen Unterschied zu der beim adulten Tier beobachteten Verteilung. Betrachtet man dagegen die Verteilung der Synapsen an den Dendriten, so sind auch in der ultrastrukturellen Verteilung der glycinergen Synapsen deutliche qualitative Unterschiede zwischen jungen und adulten Tieren zu finden.





**Abbildung 22:** Ultrastrukturelle Verteilung inhibitorischer, glyciniger Synapsen an MSO-Neuronen der adulten und jungen Wüstenrennmaus

EM-Aufnahmen zeigen qualitativ die Synapsenverteilung an MSO-Zellkörpern (ZK) und querschnittenen Dendriten (D) bei adulten und jungen Tieren. **(a)** Am Zellkörper adulter Wüstenrennmaus MSO-Zellen ist eine Vielzahl, durch Gephyrin-DAB-Färbung postsynaptisch markierter, inhibitorischer Synapsen feststellbar (rote Pfeile). **(b)** An Dendriten adulter Zellen dagegen sind nahezu keine markierten Synapsen erkennbar, die Synapsen sind daher höchstwahrscheinlich alle exzitatorisch (blaue Pfeile). Bemerkenswert ist der Astrocyt (gelbe Raute), dessen Fortsätze (schwarzer Pfeil) ein präsynaptisches Terminal einschließen. **(c)** Auch bei der jungen Wüstenrennmaus finden sich am Zellkörper viele markierte inhibitorische Synapsen (rote Pfeile). Auffällig ist der somatische Dorn (geschwungener Pfeil). **(d)** An den Dendriten junger Zellen liegen im Unterschied zu adulten Zellen markierte inhibitorische (rote Pfeile) und nicht markierte exzitatorische Synapsen (blaue Pfeile) in gleicher Häufigkeit vor.

**(a – d)** B: präsynaptische Boutons; S: dendritische Dornen; Sterne: Axone; weiße Pfeilspitzen: synaptische Vesikel; offene Pfeilspitzen: DPs; schwarze Pfeile: Astrocytenlamellen  
Maßstab: 1 µm

Wie der in Abb. 22d dargestellte quergeschnittene Dendrit zeigt, war bei der jungen Wüstenrennmaus an den Dendriten durchweg eine Vielzahl von markierten Gephyrinclustern (rote Pfeile, Abb. 22d) und damit inhibitorischen Synapsen gemischt mit nicht markierten und daher vermutlich exzitatorischen Synapsen (blaue Pfeile, Abb. 22d) in einer Schnittebene zu erkennen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die lichtmikroskopische, als auch die elektronenmikroskopische Analyse der Verteilung von Markern glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen deutliche qualitative Unterschiede zwischen jungen Wüstenrennmäusen ohne Hörerfahrung und Wüstenrennmäusen mit voll entwickeltem Hörsystem aufzeigen. Bei jungen Tieren verteilten sich die glycinergen Synapsen homogen über das Soma und die bipolaren Dendriten der MSO-Zellen. Erst nach der Ausreifung des Hörsystems im adulten Tier zeigte sich eine räumliche Beschränkung in der Verteilung der glycinergen Synapsen auf die Somaregion.

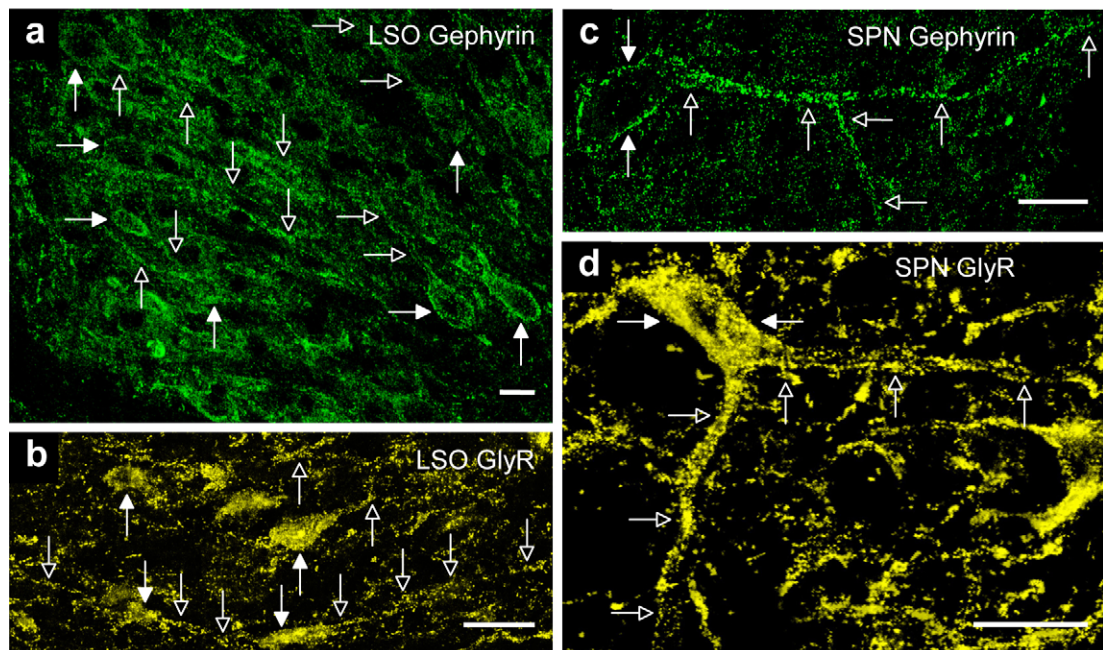
## **4.2 Verteilung von inhibitorischen, glycinergen Synapsen an Neuronen der lateralen oberen Olive (LSO) und des superioren periolivären Nucleus (SPN)**

Wenn die beobachtete Entwicklung einer räumlichen Beschränkung der inhibitorischen glycinergen Synapsen zu MSO-Neuronen bei adulten Wüstenrennmäusen eine bedeutende Rolle bei der initialen Verarbeitung von ITDs spielt, sollte sich diese Beschränkung nur bei den Neuronen finden, die nachweislich als erste ITDs verarbeiten, also bei MSO-Neuronen. Die Zellen anderer SOC-Nuclei, die ebenfalls eine bedeutende Rolle glycinerner Inhibition bei der präzisen Verarbeitung von Parametern auditorischer Signale zeigen (z.B. IIDs, zeitliche Mustererkennung), die aber eben nicht ITDs im  $\mu$ s-Bereich verarbeiten, sollten daher eine solche räumliche Beschränkung der Eingänge nicht zeigen.

Zum Vergleich mit den ITD-verarbeitenden Neuronen der MSO wurde die Verteilung von Gephyrin und Glycinrezeptorclustern in zwei weiteren Kernen des SOC, der LSO und dem SPN ebenfalls qualitativ immunhistochemisch untersucht. Sowohl im medialen, als auch im lateralen Teil der LSO von adulten Wüstenrennmäusen war für beide postsynaptischen Marker von glycinergen Synapsen, für Gephyrin (Abb. 23a), wie auch für Glycinrezeptoren (Abb. 23b) generell eine hohe Färbungsdichte feststellbar. Auf Einzelzellniveau war eine prominente Markierung für Gephyrin sowohl an den Zellkörpern (geschlossene Pfeile, Abb. 23a), als auch an den Dendriten (offene Pfeile, Abb. 23a) der LSO-Neurone feststellbar. Die räumliche Anordnung der Glycinrezeptorcluster folgte dem Muster der Gephyrinfärbung, auch hier waren sowohl die Membranen der Somata (geschlossene Pfeile, Abb. 23b), als auch die der Dendriten (offene Pfeile, Abb. 23b) dicht mit Clustern besetzt.

SPN-Neurone von adulten Tieren zeigten ebenfalls eine hohe Dichte von Markern inhibitorischer, glycinerner Synapsen (Gephyrin, Abb. 23c; Glycinrezeptor, Abb. 23d). Postsynaptische Gephyrincluster waren bei SPN-Zellen ebenfalls sowohl an den Zellkörpern (geschlossene Pfeile, Abb. 23c), als auch an den gesamten erkennbaren Dendriten zu finden (offene Pfeile, Abb. 23c). Bestätigt wurde dieser Befund durch die Verteilung von postsynaptischen Glycinrezeptoren. Die in Abb. 23d dargestellte SPN-Zelle zeigt nicht nur am Soma (geschlossene Pfeile) eine deutliche Färbung von markierten Glycinrezeptoren sondern auch beide Dendriten (offene Pfeile) sind bis in distale Bereiche dicht mit Clustern besetzt.





**Abbildung 23:** Glycinerge Eingänge zu LSO- und SPN-Neuronen in adulten Wüstenrennmäusen

Konfokale Aufnahmen fluoreszent markierter LSO (a,b) und SPN (c,d) Neurone adulter Wüstenrennmäuse. **(a)** Bei LSO-Neuronen adulter Wüstenrennmäuse liegen markierte Gephyrincluster (grün) sowohl an den Zellkörpern (gefüllte Pfeile), als auch an den Dendriten (offene Pfeile) vor. **(b)** Ebenso findet sich deutliche Färbung für Glycinrezeptoren (gelb) an den Zellkörpern (gefüllte Pfeile) und an den Dendriten (offene Pfeile) der LSO-Zellen. Trotz der nicht durchgeführten MAP2-Färbung sind die Dendriten der LSO-Zellen, wie auch der SPN-Zellen (c, d) durch den dichten Besatz an markierten Gephyrin- und Glycinrezeptorclustern deutlich als Kontur erkennbar. **(c)** Bei SPN-Neuronen adulter Wüstenrennmäuse liegen markierte Gephyrincluster (grün) in hoher Dichte am Zellkörper (gefüllte Pfeile) und den Dendriten (offene Pfeile) vor. **(d)** Übereinstimmend dazu zeigt sich deutliche Färbung für Glycinrezeptoren (gelb) sowohl am Soma (gefüllte Pfeile), als auch bis in distale Dendritenbereiche der SPN-Zellen (offene Pfeile). Maßstab: 20 µm

Beide postsynaptischen Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes zeigten damit qualitativ weder in der LSO noch im SPN bei adulten Wüstenrennmäusen eine räumlich beschränkte Anordnung, wie sie bei Neuronen der MSO gleichaltriger Tiere (adult, Abb.15b, 16a) festgestellt werden konnte. In beiden, primär nicht ITDs verarbeitenden Kernen, waren glycinerge Synapsen dabei sowohl an den Somata, als auch an den Dendriten zu finden. Die in der MSO von adulten Tieren beobachtete räumliche Beschränkung der Eingänge hat sich hier also nicht entwickelt. Die Verteilung in diesen beiden Kernen entspricht somit eher der in der MSO bei jungen (Abb. 15d, 16b) und UCA-Tieren (Abb. 15f, 16c,d) beobachteten.

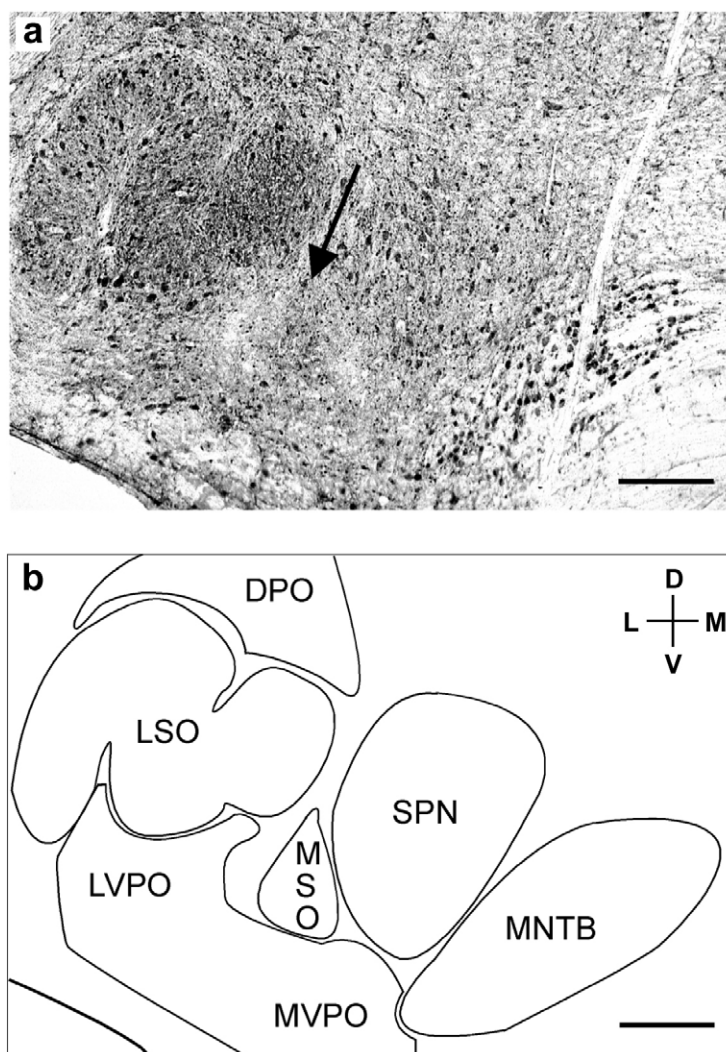
### **4.3 Verteilung inhibitorischer, glycinerger Eingänge an MSO-Neuronen bei adulten und jungen Ratten**

Wenn die Annahme zutrifft, dass die räumliche Beschränkung der inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen entscheidend für die Verarbeitung von ITDs ist, dann würde man erwarten diese nur bei den Säugern zu finden, die ein gut entwickeltes tieffrequentes Hören besitzen und daher ITDs auch nutzen können. Umgekehrt, sollte diese Verteilung nicht bei den Säugern zu finden sein, die über ein nur wenig entwickeltes tieffrequentes Hören verfügen und die aufgrund dessen ITDs höchstwahrscheinlich nicht zur Schalllokalisation nutzen. Stellvertretend für diese Gruppe von Säugetieren, deren Hörsystem nicht spezifisch an die Wahrnehmung und Verarbeitung tiefer Frequenzen angepasst ist, wurde deshalb die Verteilung glycinerger Eingänge zu MSO-Neuronen bei der adulten und der jungen Ratte (P10; zwei Tage vor Hörbeginn an P12; Blatchley et al. 1987) immunhistochemisch untersucht. Dazu wurde lichtmikroskopisch die Verteilung von präsynaptischem Glycin und postsynaptischem Gephyrin qualitativ wie auch quantitativ bestimmt. Desweiteren wurde elektronenmikroskopisch die ultrastrukturelle Verteilung von Gephyrin positiven, inhibitorischen Synapsen in den beiden Gruppen von Ratten qualitativ untersucht.

Die qualitative (Gephyrinfärbung; s.h. Kapitel 4.3.2) und quantitative Analyse (s.h. Kapitel 4.3.3) wurde in Zusammenarbeit mit A. H. Seidl (Max-Planck-Institut für Neurobiologie) durchgeführt.

#### **4.3.1 Generelle Aspekte der MSO-Anatomie bei der Ratte**

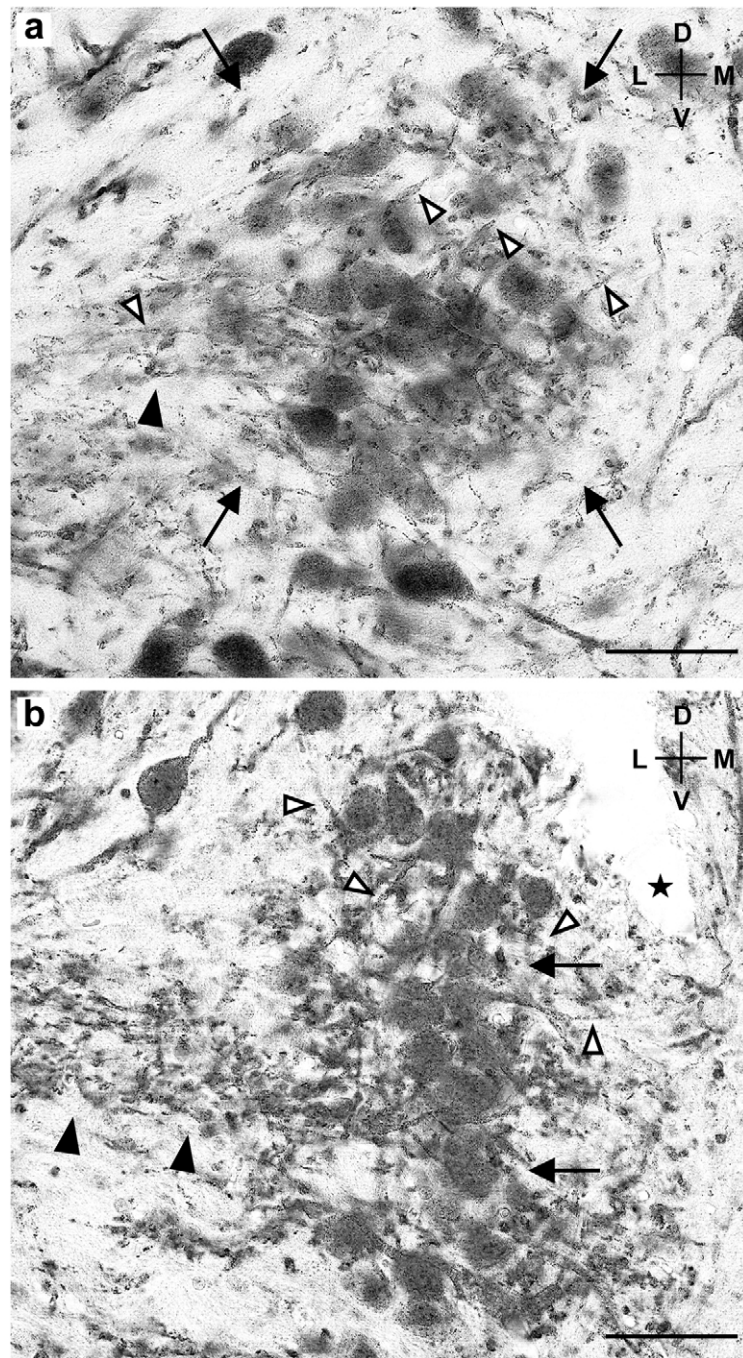
Wie aus der Übersichtsdarstellung eines gegen Glycin gefärbten Gehirnschnitts und der dazugehörigen schematischen Zeichnung (Abb. 24) hervorgeht, gliederte sich der SOC der adulten Ratte in sieben Hauptkerngebiete. Dies waren die LSO, die MSO, der SPN, und der MNTB sowie die periolivären Nuclei LVPO (lateroventraler periolivärer Nucleus), MVPO (medioventraler periolivärer Nucleus) und die Nuclei der DPO (dorsale perioliväre Region, nach Paxinos & Watson 1986). Die prominentesten Nuclei des Ratten-SOCs waren aufgrund ihrer Größe die LSO und der SPN. Die MSO der Ratte (Pfeil, Abb. 24a) war im Vergleich zu diesen beiden Kernen ein eher unscheinbarer Kern. Sie war sowohl gemessen an ihrer absoluten Größe als auch relativ, wenn man den generell größeren Hirnstamm der Ratte berücksichtigt, deutlich kleiner als die MSO bei Wüstenrennmäusen (Abb. 11) und bestand dementsprechend aus weniger Zellen. Auch die rostro – caudale Gesamtausdehnung der MSO war mit ca. 900 µm in der adulten Ratten nur in etwa halb so groß wie in der adulten Wüstenrennmaus (ca. 1800 µm).



**Abbildung 24:** Anatomische Struktur des SOC der Ratte

**(a)** Übersichtsaufnahme der linken Hälfte eines gegen Glycin gefärbten Coronalchnitts durch den SOC einer adulten Ratte (Glycin – DAB-Färbung). Die spiegelbildlich zur Mittellinie angeordnete rechte Hälfte des SOC ist nicht dargestellt. Die MSO der Ratte ist als ein, im Verhältnis eher kleiner Kern medio-ventral zur LSO und latero-ventral zum SPN zu erkennen (Pfeil). Die Zellen verteilen sich in der MSO der Ratte homogen im gesamten Nucleus, eine Trennung in Zellkörperstreifen und flankierende Dendritenbereiche wie in der Wüstenrennmaus-MSO lässt sich nicht erkennen. Glycinerge Zellen (schwarz) finden sich auch in der Ratte vor allem in MNTB und LVPO, sowie in geringer Zahl in der LSO, die MSO enthält keine glycinergen Zellen. **(b)** Die Umrisszeichnung zeigt die Abgrenzung der Hauptkerngebiete im unter (a) dargestellten SOC-Schnitt. Erkennbar sind LSO, MSO, SPN, sowie DPO (dorsale perioliväre Region), MVPO (medioventraler periolivärer Nucleus) und der zum LNTB anderer Säuger als homolog geltende LVPO (lateroventraler periolivärer Nucleus). Nomenklatur nach Paxinos & Watson 1986. D: dorsal; V: ventral; M: medial; L: lateral  
Maßstab: 250 µm

Im Gegensatz zur MSO der Wüstenrennmaus (Abb. 11, 12) waren die Zellen der Ratten-MSO vor allem im caudalen und rostralen Teil des Nucleus nicht klar strukturiert angeordnet. Wie aus der in Abb. 25a dargestellten rostralen Schnittebene hervorgeht, verteilen sich die Zellen hier eher gestreut im gesamten Nucleus.



**Abbildung 25:** Anatomie der Ratten-MSO

Übersichtsaufnahmen des MSO-Kerngebiets der adulten Ratte. Dargestellt sind eine rostrale **(a)** und eine mittig entlang der rostro – caudalen Achse des Nucleus **(b)** gelegene coronale Schnittebene durch den SOC der adulten Ratte. Die Gehirnschnitte sind immunhistochemisch gegen Gephyrin gefärbt (Gephyrin – DAB-Färbung; Schnitte in a,b stammen aus dem gleichen Tier). **(a)** Im rostralen wie caudalen (nicht dargestellt) Bereich der Ratten-MSO ist der Nucleus nicht klar strukturiert, die Zellen verteilen sich ungeordnet über das gesamte Kerngebiet (Pfeile). **(b)** Nur im Bereich der größten Ausdehnung der MSO ca. mittig zwischen rostralem und caudalem Ende findet sich eine, zur MSO der Wüstenrennmaus vergleichbare räumliche Aufteilung der MSO in einen eng begrenzten dorso – ventralen Zellkörperstreifen und flankierende, zellfreie Dendritenräume. Am deutlichsten zeigt sich die dorso – ventrale Schichtung der Zellen in der Mitte des Zellbandes (Pfeile). **(a,b)** Die Dendriten der bipolaren MSO-Neurone sind in der Ratte häufig nicht streng entlang der medio – lateralen Achse des Nucleus orientiert (offene Pfeilspitzen). Auffällig ist die Tendenz die lateralen Dendriten von mittig im Nucleus gelegenen Zellen in Bündeln zusammenzufassen (gefüllte Pfeilspitzen).

*Fortsetzung s.h. nächste Seite*

Ein eng definierter Zellkörperstreifen, sowie deutlich abgegrenzte Dendritenräume konnten in der MSO der Ratte nur in einem schmalen Bereich (ca. 250 – 300  $\mu\text{m}$  lang), in etwa mittig entlang der rostro – caudalen Achse des Nucleus, beobachtet werden (Abb. 25b). In diesem Bereich zeigte die MSO der Ratte auch ihre größte dorso – ventrale Ausdehnung. Wie die in Abb. 25b dargestellte Schnittebene aus diesem Bereich zeigt, fand sich die deutlichste dorso – ventrale Schichtung der Neurone wiederum in einem Teilbereich mittig zwischen dem ventralen und dorsalen Ende des Nucleus (Pfeile, Abb. 25b).

Bei der Betrachtung einzelner Zellen zeigte sich, dass die Dendriten der bipolaren MSO-Neurone bei der Ratte meist nicht so streng entlang der medio – lateralen Achse orientiert waren (offene Pfeilspitzen, Abb. 25a,b), wie dies bei der MSO der Wüstenrennmaus festgestellt werden konnte (Abb. 12a). Im Gegensatz zur Wüstenrennmaus-MSO zeigten die in der Mitte des Nucleus gelegenen bipolaren MSO-Neurone adulter Ratten über die gesamte rostro – caudale Ausdehnung des Nucleus eine auffallende Tendenz zur Bündelung ihrer lateralen Dendriten (gefüllte Pfeilspitzen, Abb. 25a,b). Besonders ausgeprägt war dieses Bündel wiederum in der am deutlichsten strukturierten Region der Ratten-MSO (gefüllte Pfeilspitzen, Abb. 25b). Bei den medialen Dendriten der Ratten-MSO-Zellen konnte eine solche Bündelung nicht beobachtet werden.

#### **4.3.2 Verteilung von inhibitorischen glycinergen Eingängen an MSO-Neuronen bei adulten und jungen Ratten**

Die lichtmikroskopische Untersuchung der räumlichen Anordnung immunhistochemisch markierter glycinerger Synapsen an MSO-Zellen der adulten Ratte zeigte qualitativ explizite Unterschiede zu der bei adulten Wüstenrennmäusen festgestellten Anordnung. Wie die in Abb. 26a,b dargestellte Aufnahme und Zeichnung einer Ratten-MSO-Einzelzelle zeigen, war positive Markierung für präsynaptisches Glycin (schwarz) nicht nur am Zellkörper des MSO-Neurons (gefüllte Pfeile, Abb. 26a,b) sondern auch auf den gesamten erkennbaren Dendriten (offene Pfeile, Abb. 26a,b) zu finden.

---

##### *Fortsetzung Legende zu Abbildung 25*

Anders als in adulten Wüstenrennmäusen, verteilt sich Markierung für Gephyrin bei MSO-Zellen der adulten Ratte homogen über die Somata und die bipolaren Dendriten. Die Dendriten sind durch den dichten Besatz an Gephyrinclustern deutlich als Kontur erkennbar (Pfeilspitzen).

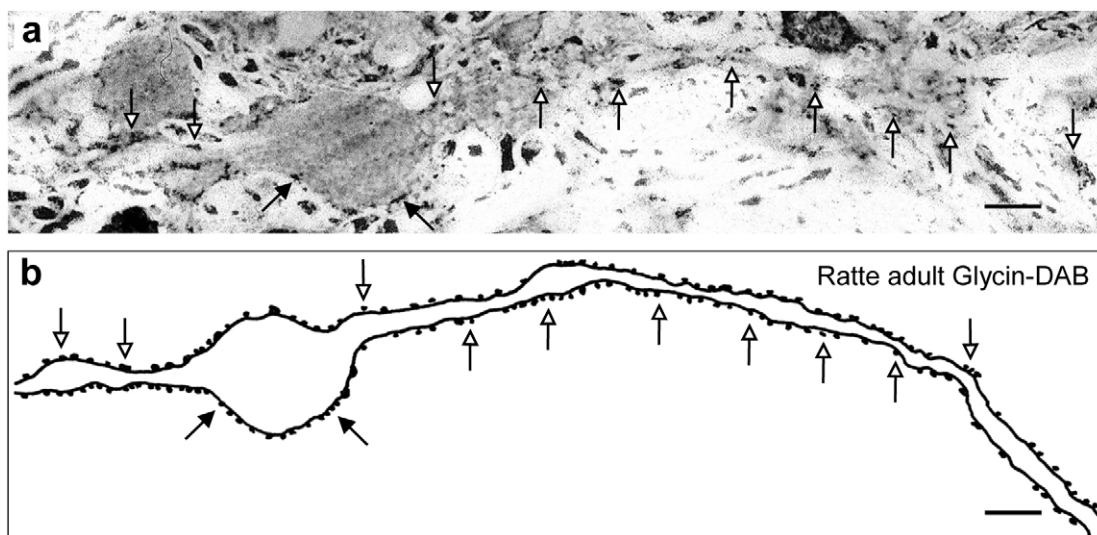
D: dorsal; V: ventral; M: medial; L: lateral; Stern: Riss im Gehirnschnitt

Maßstab: 50  $\mu\text{m}$

Die gegen Gephyrin immungefärbten Gehirnschnitte, die den Abbildungen (a) und (b) zugrundeliegen, wurden in Zusammenarbeit mit A.H. Seidl (MPI für Neurobiologie) angefertigt.

---

Bis in die distalen Bereiche der Dendriten (Abb. 26a,b; ca. 150 – 160  $\mu\text{m}$  vom Soma entfernt) waren die Membranen bei MSO-Neuronen der adulten Ratte mit glycinergen Boutons besetzt. Eine räumliche Beschränkung der glycinergen Boutons auf die Somaregion, wie sie bei MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus (Abb. 13a, 15a, 17a,b) vorlag, konnte bei MSO-Neuronen der adulten Ratte qualitativ nicht festgestellt werden. Zur Quantifizierung der Verteilung glycinерger Boutons an MSO-Neuronen der adulten Ratte siehe Kapitel 4.3.3.1.



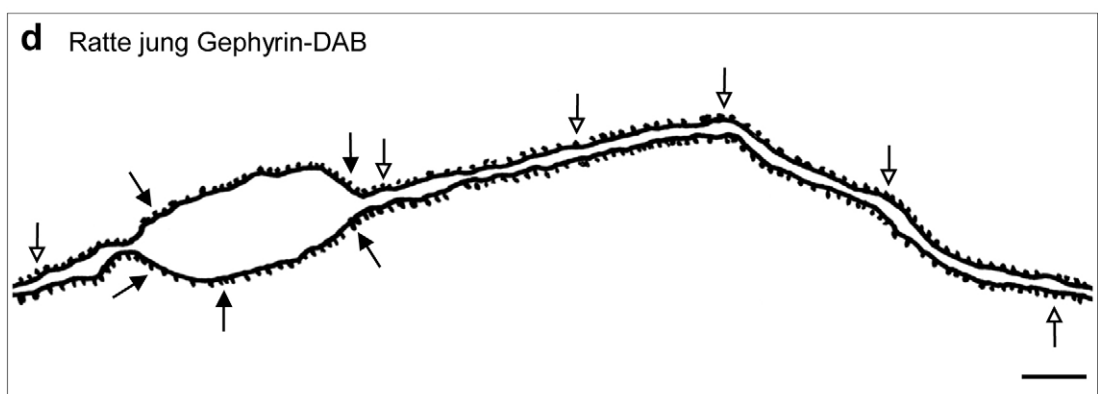
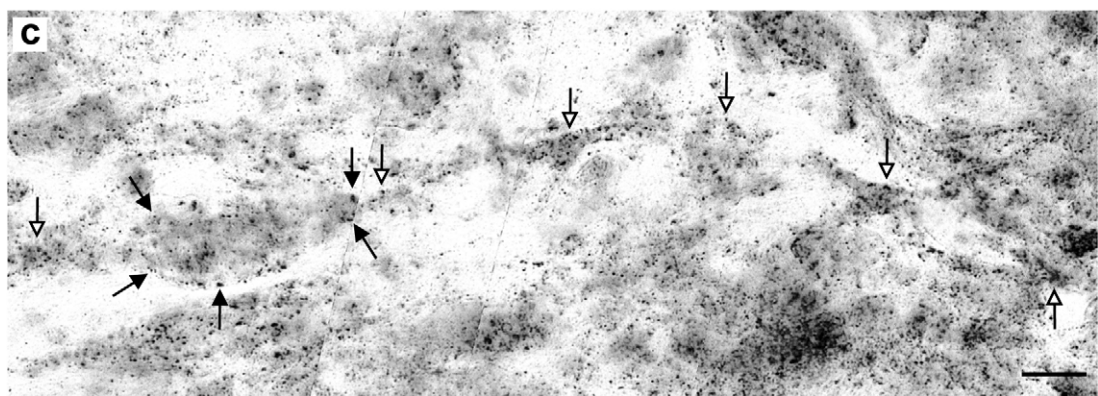
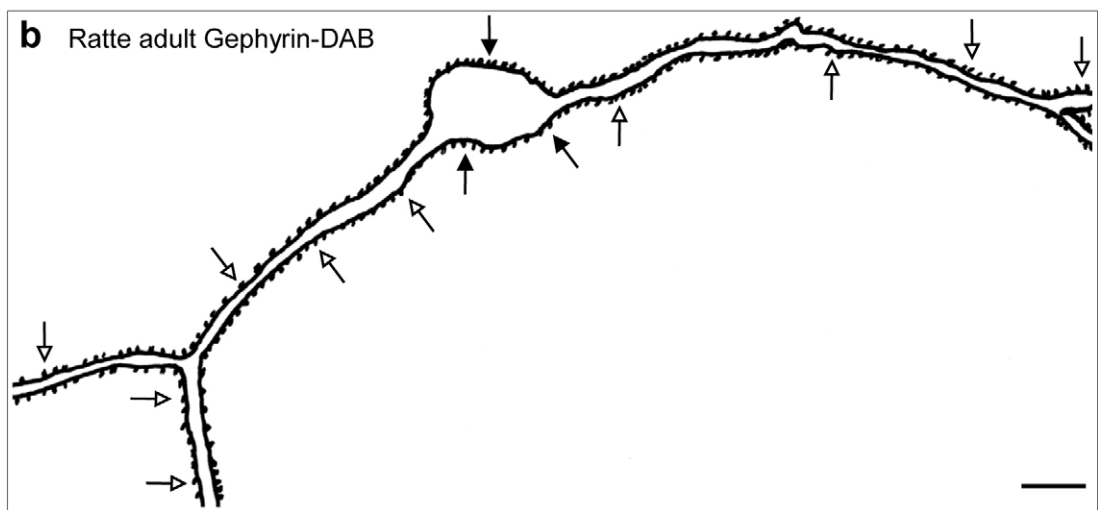
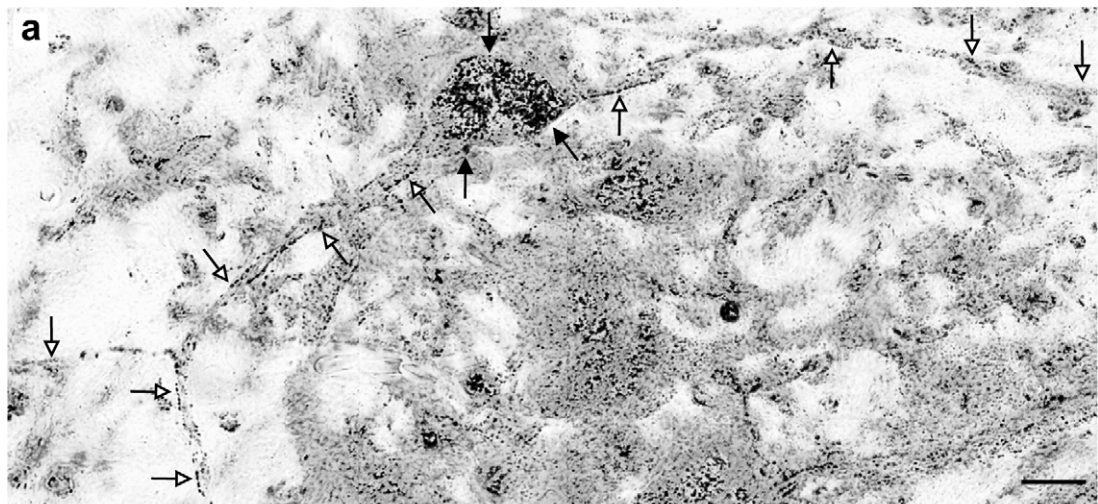
**Abbildung 26:** Verteilung von Glycin auf MSO-Neuronen der adulten Ratte

Die Aufnahme (a) und entsprechende Zeichnung (b) zeigen eine Glycin-DAB gefärbte MSO-Einzelle der adulten Ratte. Obwohl die Dendriten bei dieser immunhistochemischen Färbungsmethode nicht direkt markiert wurden, konnten sie lichtmikroskopisch aufgrund ihres Lichtbrechungsverhaltens und durch den dichten Besatz an glycinergen Boutons als Kontur eindeutig abgegrenzt werden. **(a,b)** Bei MSO-Neuronen der adulten Ratte verteilen sich markierte glycinerge Boutons (schwarze Punkte) homogen über Somata (gefüllte Pfeile) und die gesamten sichtbaren Dendriten (offene Pfeile). Bis weit in distale Bereiche der Dendriten sind markierte glycinerge Boutons erkennbar.

Maßstab: 10  $\mu\text{m}$

Auch in der räumlichen Anordnung der postsynaptischen Gephyrincluster zeigte sich an MSO-Neuronen der adulten Ratte (Abb. 27a,b), im Gegensatz zu adulten Wüstenrennmäusen (Abb. 13b, 15b), qualitativ keine räumliche Beschränkung auf die Somaregion. Wie an der Aufnahme und Zeichnung einer MSO-Einzelle der adulten Ratte in Abb. 27a,b zu erkennen, verteilten sich markierte Gephyrincluster (schwarz) gleichmäßig über das Soma (gefüllte Pfeile, Abb. 27a,b) und die gesamten erkennbaren Dendriten (offene Pfeile, Abb. 27a,b) der MSO-Zelle.





Analog zur qualitativ festgestellten Verteilung glycinерger Boutons (Abb. 26a,b), fanden sich auch Gephyrincluster bei MSO-Neuronen adulter Ratten in hoher Dichte bis in die distalen Bereiche der Dendriten (Abb. 27a,b; ca. 100 – 120  $\mu\text{m}$  vom Soma entfernt). Die räumliche Anordnung markierter Gephyrincluster an MSO-Neuronen junger Ratten (P10, zwei Tage vor Hörbeginn; Abb. 27c,d) zeigte keine qualitativen Unterschiede zu der bei adulten Ratten und jungen (Abb. 13d, 15d) sowie UCA-Wüstenrennmäusen (Abb. 15f) festgestellten homogenen Verteilung. So war auch an MSO-Neuronen junger Ratten sowohl am Soma (gefüllte Pfeile, Abb. 27c,d), als auch an den gesamten erkennbaren Dendriten (offene Pfeile, Abb. 27c,d) positive Färbung für Gephyrin (schwarz, Abb. 27c,d) nachweisbar. Bei MSO-Neuronen junger Ratten zeigten sich Gephyrincluster ebenfalls bis in distale Bereiche der Dendriten (Abb. 27c,d; ca. 130 – 150  $\mu\text{m}$  vom Soma entfernt). Zur Quantifizierung der Verteilung von Gephyrinclustern an MSO-Neuronen der adulten und jungen Ratte siehe Kapitel 4.3.3.2.

Die qualitativ-lichtmikroskopisch bestimmte räumliche Anordnung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen der adulten Ratte unterschied sich deutlich von der bei MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus festgestellten Verteilung. Die MSO-Neurone adulter, wie auch junger Ratten zeigten qualitativ eine ebenso homogene Verteilung glycinерger Synapsen an Somata und Dendriten, wie sie bereits bei MSO-Zellen junger und einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA) beobachtet werden konnte. Eine räumlich auf die Somaregion beschränkte Anordnung der glycinерgen Synapsen, wie bei adulten Wüstenrennmäusen, hat sich in der adulten Ratte nicht entwickelt.

---

**Abbildung 27:** Verteilung von Gephyrin auf MSO-Neuronen der adulten und jungen Ratte

Die Aufnahmen und entsprechenden Zeichnungen zeigen Gephyrin-DAB gefärbte MSO-Zellen der adulten (a,b) und jungen (c,d) Ratte. Obwohl die Dendriten bei dieser immunhistochemischen Färbungsmethode nicht direkt markiert wurden, konnten sie lichtmikroskopisch aufgrund ihres Lichtbrechungsverhaltens und durch den dichten Besatz an Gephyrinclustern als Kontur eindeutig abgegrenzt werden. Die Aufnahmen in (a) und (c) sind aus mehreren Fotos verschiedener Fokusebenen zusammengesetzt. **(a,b)** MSO-Neurone der adulten Ratte weisen sowohl am Soma (gefüllte Pfeile), als auch an den gesamten erkennbaren Dendriten (offene Pfeile) markierte Gephyrincluster (schwarze Punkte) auf. **(c,d)** Bei jungen Ratten ohne Hörerfahrung verteilen sich postsynaptische Gephyrincluster (schwarze Punkte) homogen über die Somata (gefüllte Pfeile) und die gesamten sichtbaren Dendriten (offene Pfeile) der MSO-Neurone.

Maßstab: 10  $\mu\text{m}$

Die gegen Gephyrin immungefärbten Gehirnschnitte, die den Abbildungen (a) und (c) zugrundeliegen, wurden in Zusammenarbeit mit A.H. Seidl (Max-Planck-Institut für Neurobiologie) angefertigt.

---



### 4.3.3 Quantifizierung der Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen adulter und junger Ratten

Zur quantitativen Analyse der bisher qualitativ festgestellten Anordnung glycinерger Synapsen wurde sowohl die Verteilung von präsynaptischem Glycin (adulte Ratte), als auch die Verteilung von postsynaptischem Gephyrin (junge und adulte Ratte) als Dichte pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran an individuellen MSO-Neuronen in DAB-gefärbtem Gewebe lichtmikroskopisch bestimmt (s.h. auch Kapitel 3.1.4.1). Die analysierten Dichtewerte von glycinерgen Boutons und Gephyrinpunkta wurden dabei auf die Dichte pro  $\mu\text{m}$  Membran am Zellkörper normalisiert. Die quantitative Analyse wurde in Zusammenarbeit mit A. H. Seidl (Max-Planck-Institut für Neurobiologie) durchgeführt.

#### 4.3.3.1 Quantifizierung der Verteilung von präsynaptischem Glycin an MSO-Neuronen der adulten Ratte

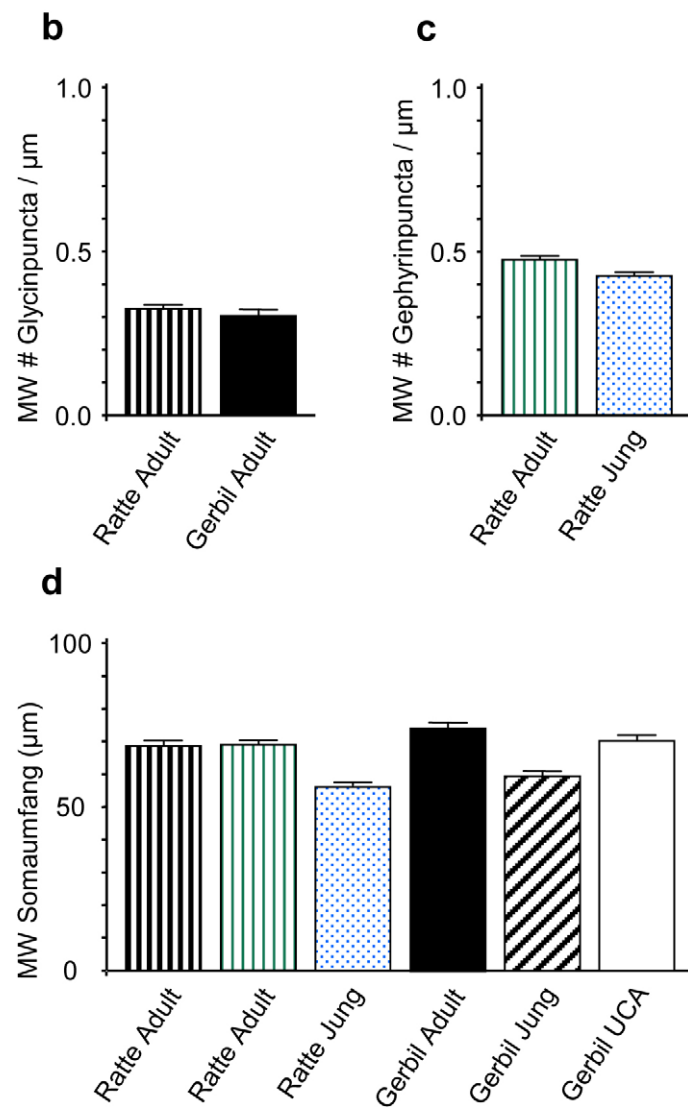
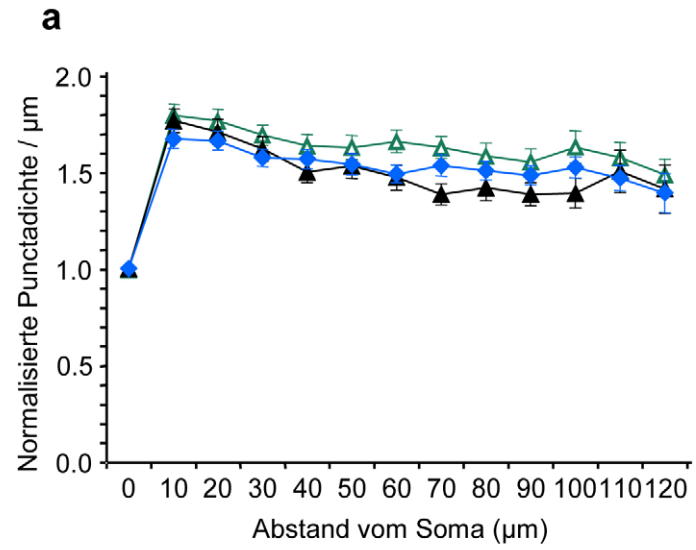
Wie die Analyse an einzelnen Neuronen zeigte, konnte bei adulten Ratten (schwarze Kurve, Abb. 28a) im Gegensatz zu den mit der gleichen Methode analysierten adulten Wüstenrennmäusen (Abb. 18a, schwarze Kurve) keine Abnahme der relativen Dichte von glycinерgen Boutons mit zunehmendem Abstand vom Soma festgestellt werden. Im Gegenteil, die relative Dichte der Boutons auf den Dendriten war bei adulten Ratten überdies noch deutlich höher als am Soma. Bereits im ersten dendritischen Zählabschnitt (10  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) stieg die relative Punktdichte im Vergleich zum Soma signifikant um 77% an ( $p < 0,001$ ; MWU-Test). Im weiteren Verlauf zu mehr distal gelegenen Dendritenabschnitten verharrte die Mittelwertkurve der relativen Punktdichte auf einem konstant hohen, deutlich über dem Somawert liegendem Niveau. Sogar im distalsten analysierten Dendritenabschnitt (120  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) lag die relative Dichte der Boutons noch über 40% höher als am Soma. Zwar reduzierte sich die relative Punktdichte vom proximalsten (10  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) zum distalsten (120  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) Dendritenabschnitt leicht, diese Abnahme war aber, wie der Vergleich der Progression der Dichtewerte von benachbarten Abschnitten zeigte, nicht signifikant ( $p > 0,28$ ; MWU-Test).

Aufgrund der Normalisierung der Daten zum Dichtewert am Soma könnte die, im Vergleich zur adulten Wüstenrennmaus extrem hohe relative Dichte von glycinерgen Boutons an Dendriten von MSO-Neuronen der adulten Ratte auch in einer, in Relation zu adulten Wüstenrennmäusen, niedrigeren Dichte von Boutons am Zellkörper begründet liegen. Die gemittelte absolute Dichte glycinерger Boutons an MSO-Somata der adulten

Ratte (Abb. 28b, längsgestreifter schwarzer Balken) zeigte jedoch mit  $0,32 \pm 0,01$  Boutons pro  $\mu\text{m}$  Zellkörpermembran keinen signifikanten Unterschied ( $p > 0,1$ ; MWU-Test) zu der bei adulten Wüstenrennmäusen festgestellten Dichte von  $0,30 \pm 0,02$  Boutons pro  $\mu\text{m}$  Zellkörpermembran (Abb. 28b, schwarzer Balken). In gleicher Weise zeigten sich beim Vergleich des mittleren Umfangs der gegen Glycin gefärbten MSO-Zellkörper keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,06$ ; MWU-Test) zwischen adulten Ratten ( $69,0 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d, längsgestreifter schwarzer Balken) und adulten Wüstenrennmäusen (adult:  $74,3 \pm 1,8 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d schwarzer Balken; UCA:  $69,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d weißer Balken). Diese Befunde zeigen eindeutig, dass die, bezüglich der Verteilung glycinерger Boutons an den Dendriten von MSO-Neuronen gemessenen Unterschiede zwischen adulten Ratten und Wüstenrennmäusen nicht durch eine unterschiedliche Verteilung der Synapsen an den Zellkörpern bedingt waren.

#### 4.3.3.2 Quantifizierung der Verteilung von postsynaptischem Gephyrin an MSO-Neuronen der jungen und adulten Ratte

Die in gleicher Weise wie die Quantifizierung glycinерger Boutons durchgeführte Analyse der Verteilung des postsynaptischen Ankerproteins Gephyrin an einzelnen MSO-Neuronen der Ratte, bestätigte die in Kapitel 4.3.3.1 festgestellten Ergebnisse. Sowohl bei adulten (grüne Kurve, Abb. 28a), als auch bei jungen Ratten ohne Hörerfahrung (blaue Kurve, Abb. 28a) verteilten sich die relativen Dichtewerte von Gephyrinclustern pro  $\mu\text{m}$  Membran homogen über die gesamte analysierte Ausdehnung der Dendriten. Der Verlauf der Mittelwertkurven der relativen Punktdichte von Gephyrinclustern an MSO-Neuronen der adulten und jungen Ratte war dabei nahezu identisch zum Kurvenverlauf der Dichte glycinерger Boutons bei der adulten Ratte (schwarze Kurve, Abb. 28a). So stieg bei adulten und jungen Ratten auch die relative Dichte von Gephyrinpunkta im ersten Dendritenabschnitt (10  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) in Relation zum Zellkörper signifikant um 79% (adulte Ratte) bzw. 67% (junge Ratte) an ( $p < 0,001$ ; MWU-Test). Von proximalen zu distalen Dendritenabschnitten zeigten beide Mittelwertkurven der relativen Punktdichte einen gleichförmigen Verlauf auf einem deutlich über dem Wert am Soma liegendem Niveau. Wie bei der Verteilung glycinерger Boutons in der adulten Ratte, so lag auch die relative Dichte der Gephyrinpunkta im distalsten Dendritenabschnitt (120  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) im Mittel noch mehr als 49% (adulte Ratte) bzw. 39% (junge Ratte) über dem Wert am Soma.



Wie der statistische Vergleich von Dichtewerten benachbarter Abschnitte ergab, war auch hier die Veränderung der Punktdichte von proximalen (10  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) zu distalen (120  $\mu\text{m}$  Abstand zum Soma) Dendritenabschnitten nicht signifikant ( $p > 0,14$ ; MWU-Test). Die Mittelwerte der relativen Dichte von Gephyrinpunkta lagen zwar bei MSO-Neuronen der adulten Ratte in allen analysierten Dendritenabschnitten etwas höher als bei Neuronen junger Ratten, die Differenzen zwischen beiden Gruppen waren jedoch sehr gering und die Dichtewerte pro Abschnitt waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich ( $p > 0,05$ ; MWU-Test). Die Verteilung der Gephyrincluster an einzelnen MSO-Neuronen der adulten Ratte unterschied sich damit deutlich von der bei adulten Wüstenrennmäusen beobachteten Verteilung (Abb. 18b, schwarze Kurve). Dagegen zeigte sich zwischen jungen Ratten und jungen Wüstenrennmäusen (Abb. 18b, blaue Kurve) qualitativ kein Unterschied in der Verteilung der Gephyrincluster.

Wie in den Kapiteln 4.1.4.1 und 4.3.3.1 erwähnt, wäre eine Proliferation oder ein Rückgang von Synapsen am Soma während der Entwicklung aufgrund der vorgenommenen Normalisierung der Werte auf die Dichte am Zellkörper nicht zu erkennen. Wie weiter bereits in diesen Kapiteln ausgeführt, könnte eine solche Veränderung der Anzahl somatischer Synapsen allerdings erheblichen Einfluss auf die dargestellte Dichteverteilung dendritischer Synapsen ausüben.

---

**Abbildung 28:** Quantifizierung der räumlichen Verteilung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen der Ratte

**(a)** Bei adulten Ratten nimmt sowohl die pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran an individuellen MSO-Neuronen gemessene relative Dichte präsynaptischer glycinерger Boutons (schwarzer Graph) als auch die mit der gleichen Methode bestimmte relative Dichte postsynaptischer Gephyrincluster (grüner Graph) innerhalb der ersten 20  $\mu\text{m}$  auf den Dendriten signifikant zu und liegt bis in distale Dendritenbereiche konstant auf hohem Niveau. Die Verteilung der relativen Dichte von Gephyrinclustern in jungen Ratten (blauer Graph) unterscheidet sich nicht von der in adulten Ratten festgestellten (grüner Graph). **(b)** Die gemittelte absolute Dichte glycinерger Boutons an MSO-Zellkörpern zeigt keine Unterschiede zwischen adulten Ratten (längsgestreifter schwarzer Balken) und adulten Wüstenrennmäusen (schwarzer Balken). **(c)** Die gemittelte absolute Dichte von Gephyrinpunkta an MSO-Zellkörpern liegt bei adulten Ratten (längsgestreifter grüner Balken) nur geringfügig höher als bei jungen Ratten (gepunkteter blauer Balken). **(d)** Unabhängig von der immunhistochemischen Methode zeigen sich im mittleren Umfang der MSO-Zellkörper keine Unterschiede zwischen adulten Ratten (Glycin: längsgestreifter schwarzer Balken; Gephyrin: längsgestreifter grüner Balken) und adulten Wüstenrennmäusen (adult Glycin: schwarzer Balken; UCA Glycin: weißer Balken), wie auch zwischen jungen Ratten (Gephyrin: gepunkteter blauer Balken) und jungen Wüstenrennmäusen (Glycin: schräggestreifter schwarzer Balken). Im Vergleich zu adulten Tieren ist der Zellkörperumfang junger Ratten und junger Wüstenrennmäuse etwas geringer.

Zu den Wüstenrennmausdaten s.h. auch Abb. 18  
Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts (SEM)

---

Um eine mögliche, entwicklungsabhängige Veränderung der Anzahl glycinerges Synapsen am Soma zu untersuchen wurde auch für die Verteilung der Gephyrinpunkta an MSO-Neuronen der adulten und jungen Ratte die absolute Dichte von Gephyrinpunkta pro  $\mu\text{m}$  Somamembran (Abb. 28c) und der Umfang der Zellkörper (Abb. 28d) bestimmt. Die gemittelte absolute Dichte von Gephyrinpunkta an MSO-Neuronen der adulten Ratte ( $0,48 \pm 0,01$  Punkta /  $\mu\text{m}$ ; Abb. 28c längsgestreifter grüner Balken) lag dabei nur geringfügig über der bei jungen Ratten ermittelten Dichte ( $0,43 \pm 0,01$  Punkta /  $\mu\text{m}$ ; Abb. 28c gepunkteter blauer Balken). Trotz der geringen Differenz unterschieden sich die Dichtewerte signifikant voneinander ( $p < 0,002$ ; MWU-Test). Der mittlere Umfang der Zellkörper der gegen Gephyrin gefärbten MSO-Neurone adulter Ratten ( $69,4 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d längsgestreifter grüner Balken) war faktisch identisch zum mittleren Umfang der gegen Glycin gefärbten Neurone adulter Ratten ( $69,0 \pm 1,6 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d längsgestreifter schwarzer Balken;  $p > 0,99$  nicht signifikant; MWU-Test). Der Somaumfang bei adulten Ratten war daher unabhängig von der Färbungsmethode. Gleichmaßen unterschied sich der Somaumfang der gegen Gephyrin gefärbten MSO-Neurone adulter Ratten nicht vom Somaumfang der gegen Glycin gefärbten MSO-Neurone adulter Wüstenrennmäuse (adult:  $74,3 \pm 1,8 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d schwarzer Balken; UCA:  $69,9 \pm 1,8 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d weißer Balken;  $p > 0,05$  nicht signifikant; MWU-Test). Im Vergleich zu den Neuronen adulter Ratten war der mittlere Umfang der MSO-Zellkörper bei den sich noch in der Entwicklung befindenden jungen Ratten erwartungsgemäß signifikant geringer ( $56,6 \pm 1,5 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d gepunkteter blauer Balken;  $p < 0,001$ ; MWU-Test). Dagegen zeigten sich zwischen jungen Ratten und jungen Wüstenrennmäusen ( $59,4 \pm 1,7 \mu\text{m}$ ; Abb. 28d schräggestreifter schwarzer Balken) keine signifikanten Unterschiede im Umfang der Zellkörper ( $p > 0,64$ ; MWU-Test). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass Veränderungen in der Dichte von glycinergen Boutons oder Gephyrinclustern an Zellkörpern von MSO-Neuronen bei Wüstenrennmäusen und Ratten nicht der beobachteten unterschiedlichen Verteilung an den Dendriten zugrunde liegen können.

Die Quantifizierung der Verteilung von präsynaptischen glycinergen Boutons und postsynaptischen Gephyrinclustern an MSO-Neuronen der nicht auf die Verarbeitung tiefer Frequenzen spezialisierten und daher höchstwahrscheinlich nicht ITDs nutzenden, adulten Ratte offenbarte wesentliche Unterschiede zu der bei tieffrequent hörenden und ITDs nutzenden, adulten Wüstenrennmäusen festgestellten Verteilung. Eine räumliche Beschränkung der beiden untersuchten Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes auf die Zellkörperregion war in der adulten Ratte nicht erkennbar. Im Gegenteil, die Rezeptorbestandteile verteilten sich bei der adulten Ratte homogen über Somata und

Dendriten. Die Verteilung bei adulten Ratten war dabei nicht statistisch signifikant von der Verteilung bei jungen Ratten ohne Hörerfahrung zu unterscheiden.

#### **4.3.4 Immun – Elektronenmikroskopische Untersuchung der Ratten-MSO**

Die qualitative Untersuchung der Ultrastruktur und Verteilung glyciniger Synapsen wurde insgesamt an ca. 120 Ultradünnschnitten der beiden MSO-Nuclei je einer adulten und jungen Ratte durchgeführt. Im EM wurden dazu unter Verwendung verschiedener Vergrößerungsstufen hunderte von MSO-Somata und Dendriten analysiert.

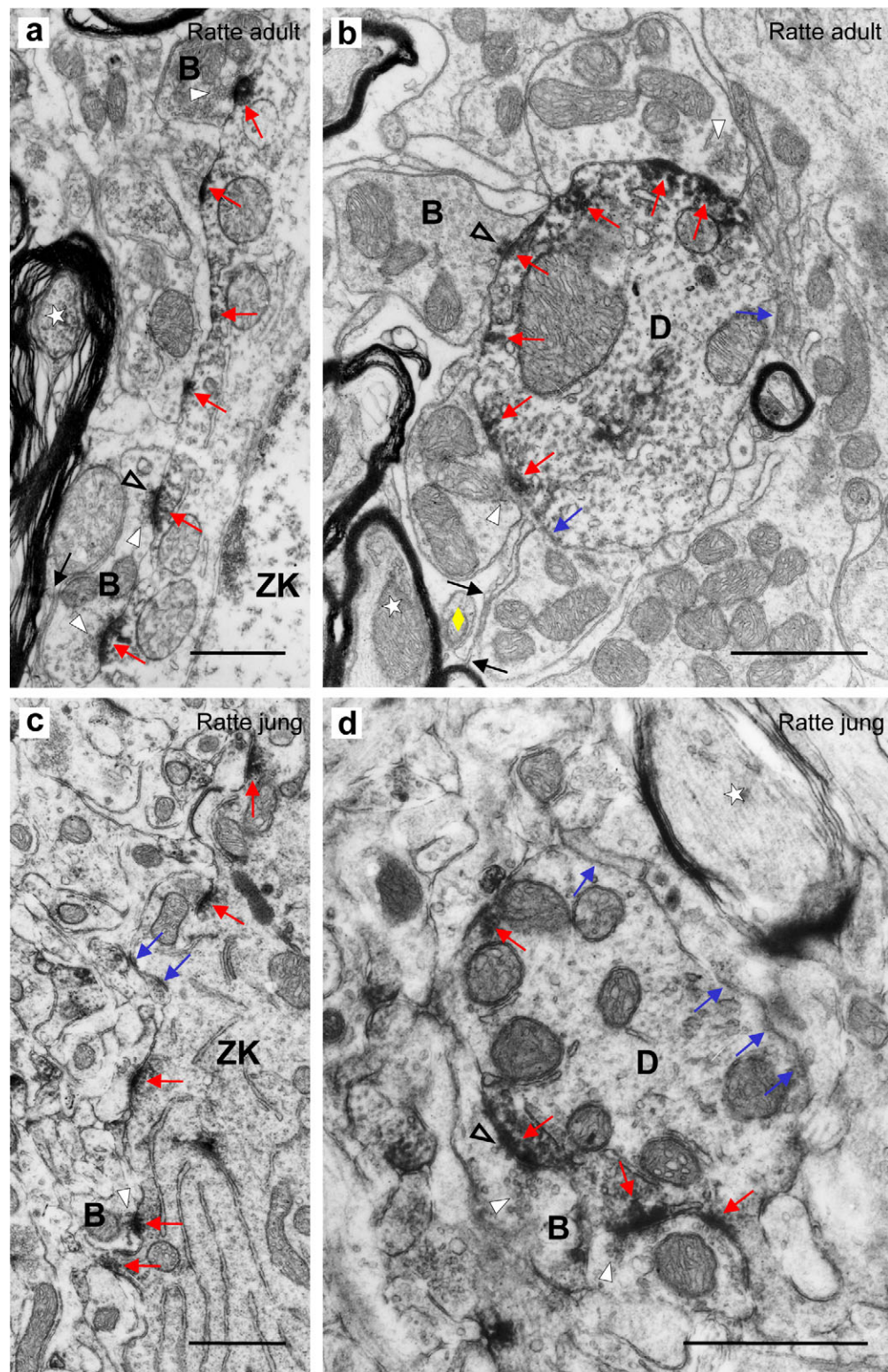
##### **4.3.4.1 Ultrastruktur der MSO bei der adulten und jungen Ratte**

Die allgemeine Ultrastruktur der durch Gephyrin – Immunhistochemie markierten inhibitorischen Synapsen an MSO-Zellen der adulten (Abb. 29a,b) und jungen Ratte (Abb. 29c,d) zeigte keine auffälligen qualitativen Unterschiede zu MSO-Neuronen von Wüstenrennmäusen gleichen Alters (Abb. 19, 20, 21, 22). Sowohl an den Zellkörpern als auch an den Dendriten waren die Membranen mit dichten Reihen von Synapsen besetzt (Abb. 29). Die elektronendichten Gephyrincluster (rote Pfeile, Abb. 29) konnten zum einen auch hier immer nur direkt unterhalb der postsynaptischen Membran der Zellen festgestellt werden, zum anderen lagen die Cluster ebenfalls immer colokalisiert mit einem präsynaptischen Terminal vor (B, Abb. 29). Wie schon bei adulten Wüstenrennmäusen beobachtet, so waren auch bei der adulten Ratte die somatischen und dendritischen präsynaptischen Boutons von prominenten, oft mehrlagigen Astrocytenlamellen umhüllt (schwarze Pfeile, Abb. 29a,b). In Abb. 29b ist ein solcher Astrocyt (gelbe Raute) zu sehen, der dünne Gliafilamente in den extrazellulären Raum zwischen zwei präsynaptischen Terminalien aussendet (schwarze Pfeile). Die Anzahl der aktiven Zonen in den präsynaptischen Terminalien variierte bei adulten Ratten unabhängig vom Typ der Synapse zwischen einer und maximal vier. Nahe der aktiven Zone oder angelagert an diese zeigten sich in den Boutons meist größere Ansammlungen von präsynaptischen Vesikeln (weiße Pfeilspitzen, Abb. 29a,b). Anders als bei MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus (Abb. 19) waren diese bei Zellen der adulten Ratte in keinem Fall in einer perlschnurartigen Reihe an die aktive Zone angelagert, sondern lagen als eher ungeordneter Pool in den Boutons vor (weiße Pfeilspitzen, Abb. 29a,b). Dieser Vesikelpool zeigte in vielen Fällen eine auffällige Zweiteilung in einen größeren, etwas von der aktiven Zone entfernt liegenden „Reservepool“ (weiße Pfeilspitze in rechtem Bouton Abb. 29b) und einige wenige direkt

an die aktive Zone angelagerte Vesikel (weiße Pfeilspitze in linkem Bouton Abb. 29a). Die Form der synaptischen Vesikel an Gephyrin-positiven Synapsen war auch hier nicht immer zweifelsfrei zu bestimmen. Soweit erkennbar war die Form der Vesikel meist abgeflacht-länglich oder es lagen verschiedene Vesikelformen in einem Bouton vor (rund, flach, oval, pleomorpher Typ). Die bereits an Synapsen zu Wüstenrennmaus-MSO-Neuronen als kleine, elektronendichte Fortsätze der aktiven Zone erkennbaren präsynaptischen Spezialisierungen (DPs, offene Pfeilspitzen, Abb. 20) konnten auch bei der adulten Ratte sowohl an einigen somatischen, wie auch dendritischen Synapsen festgestellt werden (offene Pfeilspitzen, Abb. 29a,b). Wie bei Wüstenrennmäusen, so waren auch in der Ratte an die DPs meist synaptische Vesikel angelagert.

Die Ultrastruktur der MSO bei der jungen Ratte war im allgemeinen vergleichbar zu der bei der adulten Ratte beobachteten. Wie bei jungen Wüstenrennmäusen (Abb. 21), so war auch bei der jungen Ratte an der Anatomie von prä- und postsynaptischen Elementen festzustellen, dass sich diese jungen Tiere noch in der Entwicklung befinden. So waren die Axone weit weniger stark myelinisiert und die Anzahl an Astrocytenlamellen war weitaus geringer. Dendritische Dornen konnten auch bei jungen Ratten an einigen Dendriten von MSO-Neuronen bestimmt werden, sie waren jedoch nicht so häufig wie bei jungen Wüstenrennmäusen zu finden. An den Dornen konnten sowohl markierte, inhibitorische als auch nicht markierte, exzitatorische Synapsen lokalisiert werden. Im Unterschied zur jungen Ratte, konnten an den Dendriten der MSO-Neurone der adulten Ratte keine Dornen festgestellt werden. Die markierten Gephyrincluster waren auch bei jungen Ratten immer Bestandteil einer morphologisch identifizierbaren Synapse, die alle Merkmale einer funktionellen Synapse erkennen lässt (Abb. 29c,d). Wie bei der adulten Ratte, so lagen auch beim jungen Tier die markierten postsynaptischen Gephyrincluster (rote Pfeile, Abb. 29c,d) immer colokalisiert zu einer aktiven Zone und damit zu einem präsynaptischen Bouton vor (B, Abb. 29c,d). Im Gegensatz zur adulten Ratte, konnte bei der jungen Ratte keine ausgeprägte Zweiteilung des Pools an synaptischen Vesikeln beobachtet werden. Die Vesikel lagen hier meist in kleineren Ansammlungen nahe der aktiven Zone vor, wobei immer eine nicht unerhebliche Anzahl von angelagerten Vesikeln beobachtet werden konnte (weiße Pfeilspitzen, Abb. 29c,d). Die bei jungen Wüstenrennmäusen häufig zu findende perlschnurartige Reihung der synaptischen Vesikel an der aktiven Zone konnte auch bei der jungen Ratte nicht festgestellt werden. Die Vesikelformen in den inhibitorischen präsynaptischen Boutons waren bei der jungen Ratte, soweit erkennbar, ebenfalls entweder flach und länglich oder vom pleomorphen Typ. Auch die DPs (offene Pfeilspitze, Abb. 29d) konnten an einigen Synapsen im jungen Tier gefunden werden.





**Abbildung 29:** Ultrastruktur und Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen adulter und junger Ratten

EM-Aufnahmen zeigen qualitativ die Ultrastruktur und Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Zellkörpern (ZK) und quergeschnittenen Dendriten (D) bei der adulten und jungen Ratte. Glycinерge Synapsen sind durch elektronendichte Markierung (DAB) postsynaptischer Gephyrincluster identifizierbar (rote Pfeile). (a) An Zellkörpern (ZK) adulter Ratten-MSO-Neurone sind eine Vielzahl markierter glycinерger Synapsen feststellbar (rote Pfeile).  
*Fortsetzung s.h. nächste Seite*



#### 4.3.4.2 Verteilung von elektronenmikroskopisch identifizierten inhibitorischen Synapsen an MSO-Neuronen der adulten und jungen Ratte

Die Verteilung der durch Gephyrin – Immunhistochemie markierten inhibitorischen Synapsen in der MSO bei der adulten Ratte zeigte qualitativ deutliche Unterschiede zu der bei adulten Wüstenrennmäusen festgestellten Verteilung. So waren bei der adulten Ratte nicht nur an den Zellkörpern (rote Pfeile, Abb. 29a), sondern im Gegensatz zur adulten Wüstenrennmaus, auch an den Dendriten (rote Pfeile, Abb. 29b) eine Vielzahl von markierten Gephyrinclustern zu finden. Wie der Zellkörperausschnitt (ZK) einer adulten Ratten-MSO-Zelle in Abb. 29a verdeutlicht, lagen inhibitorische Synapsen in dichter Reihung entlang der Membran (rote Pfeile). Das somatische Verteilungsmuster der Gephyrincluster zeigte damit keinen qualitativen Unterschied zum Verteilungsmuster bei der adulten Wüstenrennmaus. An den Dendriten allerdings waren im ultrastrukturellen Verteilungsmuster der glycinergen Synapsen prominente qualitative Unterschiede zwischen adulten Ratten und Wüstenrennmäusen (s.h. Abb. 22b) erkennbar. Wie der quergeschnittene Dendrit in Abb. 29b zeigt, waren bei der adulten Ratte an den Dendriten durchweg eine Vielzahl von markierten inhibitorischen Synapsen (rote Pfeile) gemischt mit nicht markierten, wahrscheinlich exzitatorischen Synapsen (blauer Pfeil) in einer Ebene erkennbar.

Das Verteilungsmuster der markierten inhibitorischen Synapsen an MSO-Neuronen der jungen Ratte zeigte keine qualitativen Unterschiede zum Verteilungsmuster bei der adulten Ratte und der jungen Wüstenrennmaus (Abb. 22c,d).

---

#### *Fortsetzung Legende zu **Abbildung 29***

**(b)** An Dendriten adulter Ratten-MSO-Neurone finden sich markierte, inhibitorische (rote Pfeile) und nicht markierte, höchstwahrscheinlich exzitatorische Synapsen (blaue Pfeile) in gleicher Häufigkeit. **(c,d)** An Zellkörpern (ZK) und Dendriten (D) junger Ratten-MSO-Neurone kommen markierte inhibitorische (rote Pfeile) gemischt mit nicht markierten, exzitatorischen Synapsen (blaue Pfeile) vor. **(a – d)** Glycinerge Synapsen an adulten und jungen Ratten-MSO-Zellen bestehen aus einem präsynaptischen Terminal (B) mit elektronendichten aktiven Zonen, die z.T. DPs tragen (offene Pfeilspitzen). Pools flacher oder pleomorpher synaptischer Vesikel (weiße Pfeilspitzen) liegen z.T. angelagert an die aktiven Zonen oder frei (b, weiße Pfeilspitze rechts) im Terminal vor. Colokalisiert zu aktiven Zonen sind unterhalb des synaptischen Spalts an der elektronendichten postsynaptischen Membran elektronendicht markierte Gephyrincluster erkennbar (rote Pfeile). Bei der adulten Ratte (a,b) werden präsynaptische Terminale von mehrlagigen Astrocytenlamellen (schwarze Pfeile) umschlossen. Auffällig ist der Astrocyt (b, gelbe Raute) dessen Fortsätze zwei präsynaptische Boutons umschließen. Die Axone (Sterne) im extrazellulären Raum zwischen den MSO-Zellen sind in der adulten Ratte stark und in der jungen Ratte nur gering myelinisiert.

Maßstab: 1 µm

---

Auch bei der jungen Ratte fanden sich an den Membranen von Zellkörpern (ZK, Abb. 29c) dichte Reihen von markierten Gephyrinclustern und damit inhibitorischen Synapsen (rote Pfeile, Abb. 29c), die gemischt mit nicht markierten, wahrscheinlich exzitatorischen Synapsen vorlagen (blaue Pfeile, Abb. 29c). Das Verteilungsmuster der Synapsen an den Dendriten von MSO-Neuronen der jungen Ratte unterschied sich qualitativ nicht von der Verteilung am Soma. Wie das Beispiel eines quergeschnittenen Dendriten in Abb. 29d verdeutlicht, zeigte sich an den dendritischen Membranen immer eine relativ homogene Mischung aus markierten inhibitorischen (rote Pfeile, Abb. 29d) und nicht markierten, vermutlich exzitatorischen Synapsen (blaue Pfeile, Abb. 29d).

Die ultrastrukturelle Verteilung von inhibitorischen, glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen der adulten Ratte zeigte deutliche qualitative Unterschiede zu der bei adulten Wüstenrennmäusen beobachteten Verteilung. Eine räumliche Beschränkung der inhibitorischen Synapsen auf die Zellkörperregion hat sich in der vorwiegend hochfrequent hörenden, adulten Ratte nicht entwickelt. Sowohl die junge als auch die adulte Ratte zeigte qualitativ eine ebenso homogene Verteilung der Synapsen über Somata und Dendriten wie sie bereits bei jungen Wüstenrennmäusen (zwei Tage vor Hörbeginn) festgestellt werden konnte. In der generellen Anatomie der Synapsen zeigten sich dagegen zwischen Ratten und Wüstenrennmäusen entsprechenden Alters keine substantiellen Unterschiede.

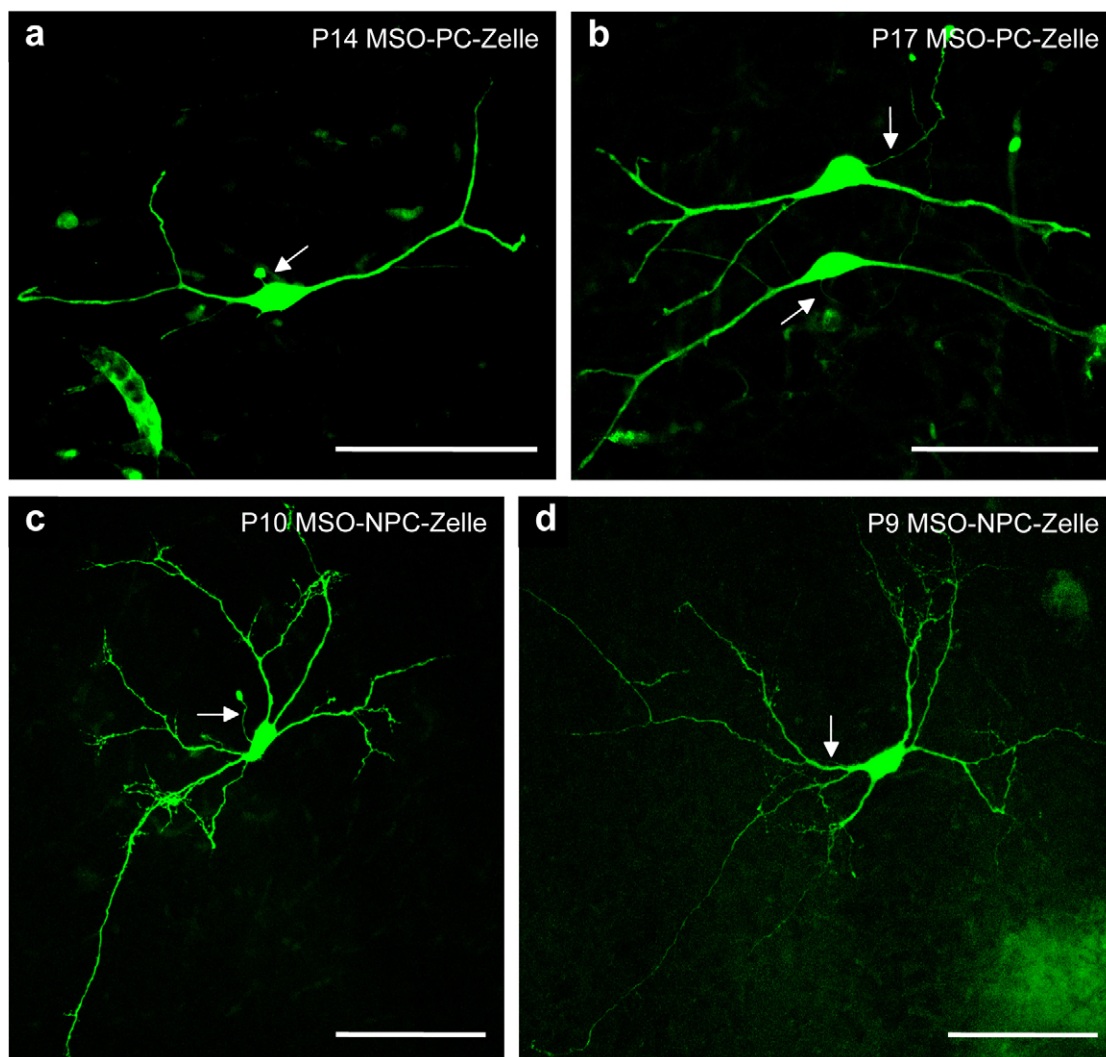
#### **4.4 Elektrophysiologische Charakterisierung der Entwicklung inhibitorischer, glycinерger Eingänge zu Neuronen der MSO in der Wüstenrennmaus**

Zur Untersuchung der Entwicklung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus wurden an insgesamt 36 Zellen von Tieren verschiedener Entwicklungsstufen (Hörbeginn P12 – P17) intrazelluläre Ableitungen mit der PCL-Technik im Ganzzellmodus durchgeführt. Der Zelltyp wurde nach Lage der Zellen innerhalb der MSO und ihrer Anatomie bestimmt. An MSO-PC-Zellen wurden sowohl die altersabhängige Entwicklung der intrinsischen zellulären Eigenschaften, als auch die altersabhängige Entwicklung des Zeitverlaufs der synaptischen Potentiale und Ströme untersucht.

##### **4.4.1 Einteilung der Neurone nach ihrer Anatomie und Lage innerhalb der MSO**

Während der Ableitungen war die MSO je nach Alter des Tieres in drei bis fünf Schnitten erkennbar und konnte aufgrund der charakteristischen, streifenförmigen Anordnung der Zellkörper der Neurone klar abgegrenzt werden. Bei der Betrachtung mit DIC-Optik konnten die meisten Zellen an Hand ihrer Lage im Zellkörperstreifen, an der Form der Somata und soweit dies möglich war am Ursprung der proximalen Dendriten als MSO-PC-Zellen klassifiziert werden. Zur Charakterisierung der Zelltypen wurden einige Neurone (P14: 9 / 15; P17: 7 / 13) während der Ableitungen mit Neurobiotin gefüllt und später immunhistochemisch fluoreszent markiert (s.h. Kapitel 3.1.4.2 und 3.2.3). Im wesentlichen konnten dabei anatomisch die gleichen zwei Zelltypen unterschieden werden, die von Smith (1995) im Meerschweinchen beschrieben wurden (PC- und NPC-Zellen). Der weitaus größte Teil der Zellen zeigte die typischen Merkmale der MSO-PC-Zellen mit einer eher ovalen Form des Zellkörpers und zwei dicken Dendriten die orthogonal zur Achse des Zellbandes am medialen und lateralen Pol der Zellen entsprangen (Abb. 30a,b). Die Dendriten der PC-Zellen waren meist über einen weiten Bereich unverzweigt, erst mit größerem Abstand vom Soma waren einige wenige Verzweigungen zu beobachten (Abb. 30a,b). Die PC-Zellen lagen immer im zentralen Zellkörperstreifen. Häufig war bei mehreren gefüllten Zellen innerhalb einer MSO die dorso – ventrale Schichtung der Zellen mit nahezu paralleler Ausrichtung der Dendriten festzustellen (Abb. 30b). Soweit dies erkennbar war ( $n = 9 / 10$  gefüllten PC-Zellen), entsprangen die Axone (Pfeile, Abb. 30a,b) nahezu ausschließlich am Soma der Zellen und zogen innerhalb des Zellkörperstreifens in

dorsaler Richtung ( $n = 8 / 9$ ). In ihrer Morphologie zeigten die Zellen von P14- und P17-Tieren keine offensichtlichen Unterschiede.



**Abbildung 30:** Zelltypen in der MSO der Wüstenrennmaus

Die konfokalen MIPs von vier, während der *in vitro* Ableitungen mit Neurobiotin gefüllten Neurone (grün) zeigen die beiden Hauptzelltypen der MSO. **(a,b)** MSO-PC-Zellen aus Hirnschnitten 14 (a, P14) und 17 Tage alter Wüstenrennmäuse (b, P17). In beiden Altersstufen zeigt sich die typische PC-Zellen Anatomie mit einer ovoiden Form des Zellkörpers und starken, medio-lateral orientierten, bipolaren Dendriten, die in relativ großem Abstand zum Soma nur sehr wenige Verzweigungen zeigen. Die beiden Zellen in (b) zeigen die dorso-ventrale Schichtung der Zellen im Zellband. Bemerkenswert ist die nahezu parallele Ausrichtung der Dendriten. Die Axone der PC-Zellen (Pfeile) entspringen am Soma und ziehen im Zellband nach dorsal. **(c,d)** MSO-NPC-Zellen aus Hirnschnitten 9 (c, P9) und 10 Tage alter Tiere. NPC-Zellen liegen meist außerhalb oder am Rand des Zellbands, sind typischerweise multipolare Zellen mit variabler Somaform und mehreren dünnen, stark verzweigten Dendriten. Die Axone (Pfeile) entspringen am Soma und ziehen in variable Richtungen. Die Zellen in (c) und (d) entstammen Vorexperimenten die nicht Thema der Arbeit sind. Maßstab: 100 µm

Der zweite, weitaus seltenere Zelltyp, die sog. NPC-Zellen (Abb. 30c,d) lagen meist nicht innerhalb des Zellkörperstreifens. Sie konnten als isolierte Neurone im dendritischen

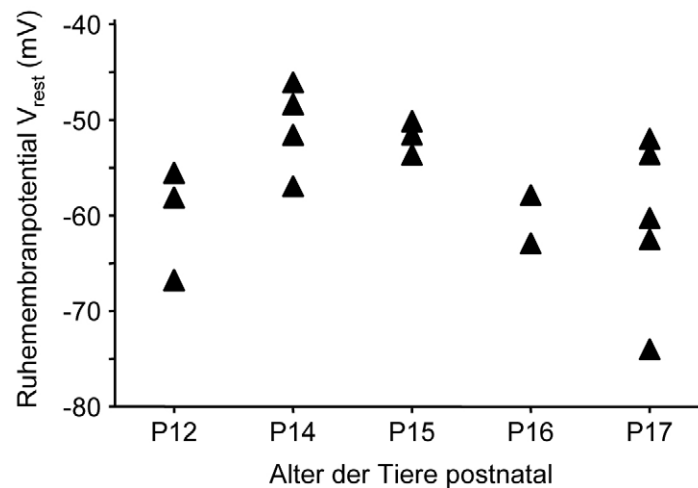
Neuropil oder in randständiger Lage am dorsalen oder ventralen Ende der MSO festgestellt werden. Die NPC-Zellen waren immer multipolare Zellen. Von den in ihrer Form sehr variablen Somata (rund bis deutlich ovoid) entsprangen meist vier bis sechs eher dünne Dendriten, die sich schon nah am Soma stark verzweigten (Abb. 30c,d). Im Gegensatz zur streng medio – lateralen Ausrichtung der PC-Zellen zeigten die NPC-Zellen keine bevorzugte Orientierung ihrer Dendriten an einer der Achsen des Nucleus. Soweit es erkennbar war ( $n = 5 / 6$  gefüllten NPC-Zellen), entsprangen auch die Axone der NPC-Zellen nahezu ausschließlich am Soma ( $n = 4 / 5$ ). Die Axone der NPC-Zellen zeigten allerdings, im Unterschied zu Axonen der PC-Zellen, keine klar zu bestimmende Vorzugsrichtung in ihrer Projektion.

In die folgenden Untersuchungen zu intrinsischen und synaptischen Eigenschaften der MSO-Neurone gingen nur PC-Zellen ein, die an Hand der obigen Kriterien als solche klassifiziert werden konnten. Aufgrund ihrer Lage, Anzahl und schon bekannter elektrophysiologischer Eigenschaften (Grothe & Sanes 1993, 1994; Smith 1995) stellen sie mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit den Zelltypus dar, der die Verarbeitung von ITDs in der MSO leistet (Grothe & Sanes 1993, 1994; Smith 1995).

#### **4.4.2 Entwicklung der intrinsischen Eigenschaften der MSO-Neurone nach Hörbeginn**

##### **4.4.2.1 Ruhemembranpotential und passive Membrankapazität**

Das Ruhemembranpotential ( $V_{\text{rest}}$ ) der MSO-Neurone aus den untersuchten Altersstufen (P12 – P17) lag zwischen -46 und -74 mV ( $n = 17$ ). Wie aus Abb. 31 hervorgeht, zeigten sich keine Unterschiede in  $V_{\text{rest}}$  zwischen Neuronen von Tieren am Hörbeginn (P12) und den am weitesten entwickelten Neuronen am Postnataltag 17. Lediglich die Neurone von P14- und P15-Tieren schienen auf einem etwas depolarisierteren Niveau zu liegen. Diese Abweichungen waren allerdings nicht besonders groß und lagen innerhalb der Schwankungsbreite der Gesamtpopulation. Es zeigten sich daher keine offensichtlichen Unterschiede in  $V_{\text{rest}}$  in Abhängigkeit vom Alter der untersuchten Tiere. Gemittelt über alle Altersstufen ergab sich ein Wert von  $-57 \pm 2$  mV ( $n = 17$ ). Der Mittelwert war damit ähnlich zu dem, bei der Ableitung mit scharfen Elektroden in adulten Wüstenrennmäusen (Grothe & Sanes 1993:  $-56 \pm 4$  mV (SD); 1994: -51,2mV) und adulten Meerschweinchen (Smith 1995: -58 – -67mV), sowie dem mit der PCL-Technik in P3 – P14-Ratten (Smith et al. 2000:  $-58,3 \pm 1.1$  mV (SEM)) ermittelten Wert.



**Abbildung 31:** Ruhemembranpotential der MSO-Neurone

Die Graphik zeigt das Ruhemembranpotential  $V_{\text{rest}}$  der einzelnen, in den verschiedenen Altersstufen untersuchten MSO-Neurone ( $\blacktriangle$ ). Neurone zwischen Postnataltag 12 (P12) und 17 (P17) zeigen keine Unterschiede in ihrem Ruhemembranpotential.

Wie die Untersuchungen im VC-Modus zeigten, lag die Membrankapazität  $C_m$  der MSO-Neurone bei  $62,2 \pm 5,9$  pF (P14 – P17;  $n = 16$ ; Tab. 16), was nach der allgemeinen Regel für Neurone ( $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ ; Antic 2003) auf eine große Membranfläche und damit auf große Zellen schließen lässt. Die Unterschiede zwischen Neuronen von 14 und 17 Tage alten Tieren waren dabei nicht signifikant ( $p > 0,54$ ; MWU-Test). Da von 15 und 16 Tage alten Tieren nur jeweils eine Zelle im VC-Modus untersucht wurde, konnten sie nicht in die statistische Analyse einbezogen werden. Weil die gemessenen Werte der beiden Zellen aber innerhalb der Schwankungsbreite der Gesamtpopulation ( $17,9 - 99,6$  pF; P14 – P17;  $n = 16$ ) lagen, wurden sie zur Berechnung des Mittelwerts von  $C_m$  mit herangezogen.

**Tabelle 16:** Membrankapazität  $C_m$  der MSO-Neurone

Experimentelle Gruppe <i>in vitro</i>	P14	P15	P16	P17
Membrankapazität $C_m$ (pF)	$58,9 \pm 8,4$ ( $n = 7$ )	$89,4$ ( $n = 1$ )	$28,7$ ( $n = 1$ )	$66,4 \pm 8,4$ ( $n = 7$ )

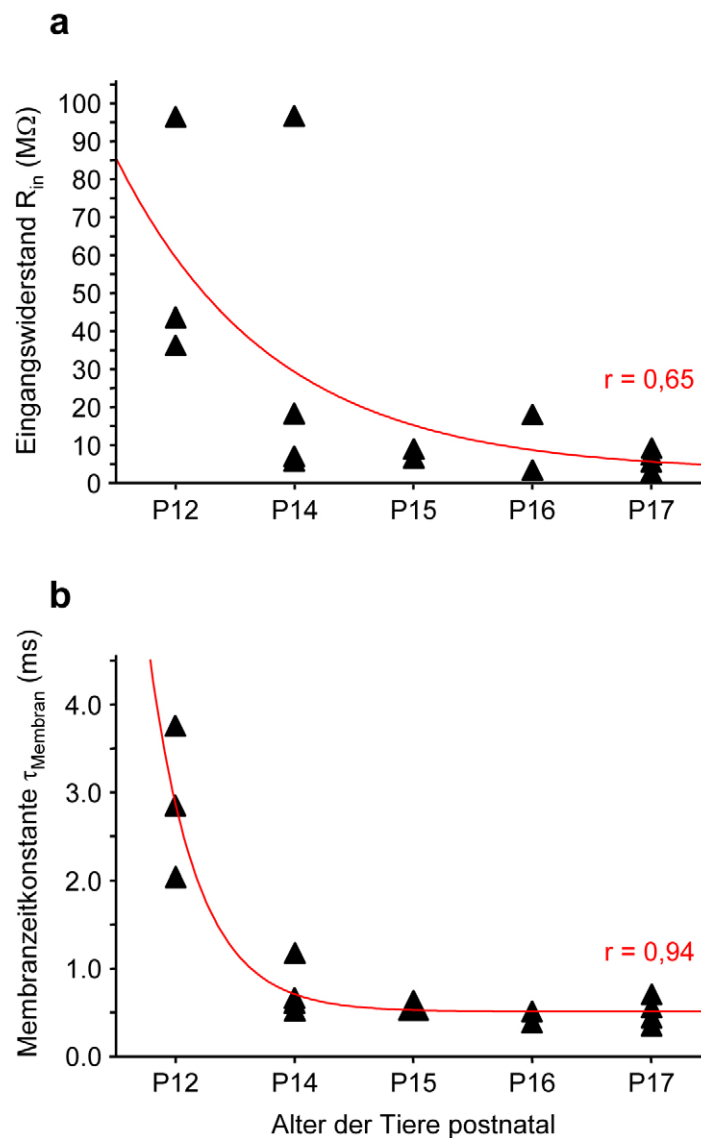
Die Membrankapazität  $C_m$  als ein konstanter Parameter der passiven Membraneigenschaften ist positiv mit der Membranfläche der Neurone korreliert.  $C_m$  ist ein Maß für die Menge an Ladung, die benötigt wird eine bestimmte Spannung in der Zelle zu erreichen ( $C_m = Q/U$ ) und hat direkten Einfluss auf die passive Membranzeitkonstante der Zellen ( $\tau_{\text{mem}} = C_m \cdot R_m$ ).  $C_m$  von MSO-Zellen aus den verschiedenen Altersstufen wurde im VC-Modus gemessen.  $C_m$  lag unabhängig vom Alter der Tiere auf hohem Niveau ( $17,9 - 99,6$  pF, P14 – P17,  $n = 16$ ). Zwischen Neuronen von P14- und P17-Tieren zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ( $p > 0,54$ ; MWU-Test).

#### 4.4.2.2 Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante

Der nach dem Ohmschen-Gesetz aus einer Membranpotentialänderung und dem dafür injizierten Strom niedriger Intensität (100 / 300 pA) berechnete Eingangswiderstand der Zellen nahe zum Ruhemembranpotential ( $R_{in}$ ) gibt als ein wichtiger Parameter speziell Aufschluss über die passiven Membraneigenschaften der Zellen. Denn durch die Injektion von Strompulsen niedriger Intensität sollten zusätzlich zu den um das Ruhemembranpotential der Zellen aktiven Leitfähigkeiten keine weiteren spannungsgesteuerten Ionenkanäle aktiviert werden. Der hier untersuchte Eingangswiderstand der Zellen zeigt daher, in welchem Umfang Leitfähigkeiten am Ruhemembranpotential der Zellen aktiv sind. Die Größe des Eingangswiderstandes gibt damit Aufschluss über die Fähigkeit der Zellen unterschwellige synaptische Potentiale zu integrieren. Da der nahe zum Ruhepotential gemessene Eingangswiderstand zum Großteil vom Membranwiderstand  $R_m$  (Abb. 8) abhängt, stellt er gleichzeitig eine Abschätzung von  $R_m$  dar. Dies ist von großem Vorteil, da  $R_m$  nicht direkt messbar ist.

Der Eingangswiderstand der MSO-Neurone nahe am Ruhepotential verringerte sich ausgehend vom Hörbeginn an P12 mit zunehmendem Alter deutlich (Abb. 32a). Bei Neuronen von P12-Tieren lag der Eingangswiderstand mit einer Schwankungsbreite von 36,2 – 96,3 M $\Omega$  ( $n = 3$ ) auf einem, im Vergleich zu Neuronen älterer Tiere (P14 – P17) merklich erhöhten Niveau. Zudem wies die deutliche Variabilität im Eingangswiderstand auf einen gerade in diesen Neuronen beginnenden Entwicklungsprozess hin, der wahrscheinlich unter anderem die Expression von neuen und/oder veränderten Kaliumleitfähigkeiten einschloss (s.h. auch Kapitel 4.4.2.3). Zwei Tage nach Hörbeginn bei P14 zeigte sich ein gemischtes Bild. Im Großteil der untersuchten Neurone (3 / 4) war der Eingangswiderstand bereits deutlich erniedrigt und lag bei diesen drei Neuronen mit Werten zwischen 5,7 und 18,1 M $\Omega$  (P14, Dreiecke unterhalb roter Kurve, Abb. 32a) bereits in etwa in dem Bereich, wie ihn auch die am weitesten entwickelten Neurone an P17 zeigten. Allerdings war bei einer P14-Zelle ein ähnlich hoher Widerstand (96,6 M $\Omega$ ) wie bei P12-Zellen zu beobachten. Dies könnte darauf hinweisen, dass die oben genannten Entwicklungsprozesse am Postnataltag 14 noch stattfinden, bzw. noch nicht in allen Neuronen abgeschlossen sind. Die beiden an P15 und P16 untersuchten Zellen zeigten bereits sehr niedrige Eingangswiderstände von 6,8 / 8,9 M $\Omega$  (P15, Abb. 32a) und 3,4 / 17,9 M $\Omega$  (P16, Abb. 32a). Sie waren dabei qualitativ nicht mehr von den am weitesten ausgereiften Neuronen (P17) zu unterscheiden. Der Eingangswiderstand der untersuchten P17-Zellen schließlich war im Vergleich zu P12-Zellen deutlich erniedrigt. Der Widerstand der Membran lag in diesen Zellen in einem sehr schmalen Bereich zwischen

2,9 – 9,2 M $\Omega$  ( $n = 4$ ; Abb. 32a) und zeigte mit 2,9 M $\Omega$  das absolute Minimum der gesamten untersuchten Population an MSO-Neuronen. Damit war eine offensichtliche Entwicklung hin zu sehr niedrigen Eingangswiderständen bei MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus mit zunehmender Hörerfahrung feststellbar.



**Abbildung 32:** Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante der MSO-Neurone

Die Graphik zeigt für die verschiedenen Altersstufen den Eingangswiderstand  $R_{in}$  (a) und die Membranzeitkonstante  $\tau_{Membran}$  (b) der einzelnen untersuchten MSO-Neurone ( $\blacktriangle$ ). **(a)** Mit zunehmendem Alter und damit Entwicklungsstand der Tiere nach Hörbeginn verringert sich  $R_{in}$  deutlich, die stärksten Veränderungen sind zwischen P12 und P15 zu erkennen. Die an die Daten angepasste Exponentialfunktion ( $r = 0,65$ ; roter Graph) zeigt eine nichtlineare Abhängigkeit des Eingangswiderstandes vom Alter der Tiere / Neurone. **(b)** Die Membranzeitkonstante verkürzt sich mit zunehmendem Alter / Entwicklungsstand der Tiere nach Hörbeginn deutlich, die markanteste Beschleunigung von  $\tau_{Membran}$  ist in den ersten zwei Tagen nach Hörbeginn (P12 – P14) zu erkennen. Eine an die Daten angepasste Exponentialfunktion ( $r = 0,95$ ; roter Graph) zeigt die nichtlineare Abhängigkeit der Membranzeitkonstante vom Alter / Entwicklungsstand der Tiere / Neurone. Großes  $\blacktriangle$  bei P15 in (b): zwei Neurone mit faktisch identischem  $\tau_{Membran}$



Eine an die Daten angepasste Exponentialfunktion ( $r = 0,65$ ; rote Kurve, Abb. 32a) verdeutlichte diesen Trend und zeigte eine nichtlineare Abhängigkeit des Eingangswiderstandes vom Alter und damit vom Entwicklungsstand und der Hörerfahrung der Tiere.

Die nahe dem Ruhepotential berechnete Membranzeitkonstante  $\tau_{\text{Membran}}$  ist als ein weiterer Parameter der passiven Membraneigenschaften ebenfalls von entscheidender Bedeutung für die Integration von synaptischen Potentialen. So gibt die Zeitdauer von  $\tau_{\text{Membran}}$  beispielsweise Auskunft über die Fähigkeit der Zellen synaptische Signale zeitlich zu summieren. Der Verlauf der Entwicklung der nahe zum Ruhepotential der Zellen bestimmten Membranzeitkonstante  $\tau_{\text{Membran}}$ , die wiederum von der Membrankapazität und vom Eingangswiderstand abhängt, zeigte über die gleichen Altersstufen nach Hörbeginn ebenfalls einen klaren Trend hin zu einer deutlichen Beschleunigung mit zunehmendem Alter (Abb. 32b). Die längsten Membranzeitkonstanten, mit Werten zwischen 2,04 – 3,76 ms ( $n = 3$ ), konnten bei MSO-Neuronen von Tieren am Postnataltag 12, also unmittelbar am Beginn der Verarbeitung von Luftschall, festgestellt werden. Wie bereits erwähnt, könnte dieser Befund zusammen mit der im Vergleich zu Neuronen von P14 – P17-Tieren relativ großen Streuung der Werte (P12, Abb. 32b) auf einen gerade ablaufenden Entwicklungsprozess hinweisen, der in einer Beschleunigung von  $\tau_{\text{Membran}}$  resultiert. Schon bei Zellen zwei Tage älterer Tiere (P14, Abb. 32b) waren die Membranzeitkonstanten merklich kürzer (0,52 – 1,17 ms), drei von vier Zellen erreichten dabei bereits sehr schnelle  $\tau_{\text{Membran}}$ -Werte von unterhalb einer Millisekunde (0,52 ms / 0,63 ms / 0,65 ms). Sie lagen damit bereits im Bereich der ältesten untersuchten Neurone (P17, Abb. 32b). Im Vergleich zu P12-Zellen war bei P14-Zellen die Streuung der Werte schon deutlich geringer. Die beiden drei (P15, Abb. 32b), bzw. vier Tage (P16, Abb. 32b) nach Hörbeginn untersuchten MSO-Neurone zeigten keine weitere nennenswerte Beschleunigung von  $\tau_{\text{Membran}}$ . In beiden Altersstufen konnten sehr schnelle Membranzeitkonstanten von deutlich unter einer Millisekunde nachgewiesen werden (P15: 0,58 ms / 0,59 ms; P16: 0,51 ms / 0,39 ms). Fünf Tage nach Hörbeginn, am Postnataltag 17, zeigten die ältesten hier untersuchten Neurone im Vergleich zu P14 – P16-Zellen keine weitere auffällige Verkürzung in ihren Membranzeitkonstanten (P17, Abb. 32b). Die untersuchten P17-Zellen lagen alle innerhalb eines schmalen Bereichs sehr schneller  $\tau_{\text{Membran}}$ -Werte (0,35 – 0,71 ms). An P17 konnte auch die Zelle mit der schnellsten Membranzeitkonstante der untersuchten Population von MSO-Neuronen mit einem  $\tau_{\text{Membran}}$  von 350  $\mu\text{s}$  festgestellt werden. Bereits kurz nach Hörbeginn, mit zunehmender Hörerfahrung zeigte sich somit in MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus eine Entwicklung

hin zu sehr schnellen Membranzeitkonstanten. Der markanteste Sprung in der Entwicklung war dabei in den ersten zwei Tagen nach Hörbeginn zu beobachten (P12 – P14). Eine an die Daten angepasste Exponentialfunktion ( $r = 0,94$ ; rote Kurve, Abb. 26b) verdeutlichte die nichtlineare Abhängigkeit der Membranzeitkonstante vom Alter und damit vom Entwicklungsstand und der Hörerfahrung der Tiere.

#### 4.4.2.3 Strom – Spannungsbeziehung ( $I / V$ – Kurven)

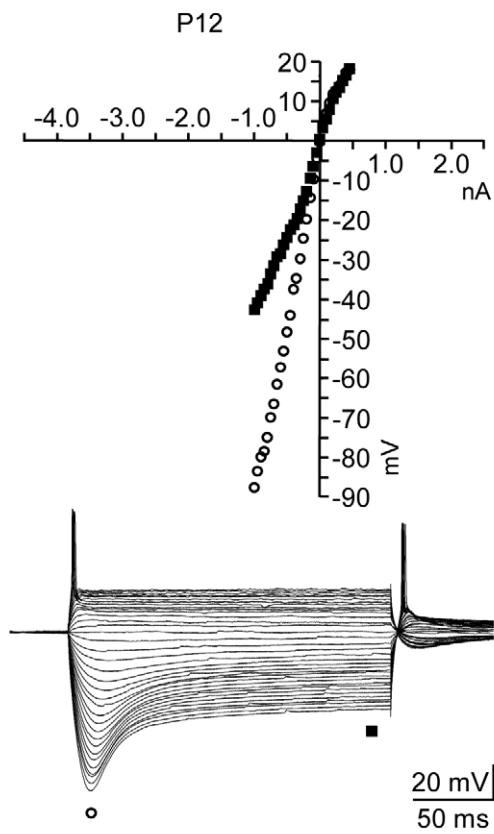
Zur Charakterisierung von zellulären Eigenschaften, die erheblichen Einfluss auf die Integration von inhibitorischen und exzitatorischen synaptischen Eingängen haben, wie beispielsweise die Aktivierung spannungsgesteuerter Ionenkanäle, wurde die Strom – Spannungsbeziehung in MSO-Neuronen der verschiedenen Altersstufen untersucht. Dabei zeigte die Spannungscharakteristik der MSO-Neurone in Antwort auf, durch die Elektrode injizierte depolarisierende oder hyperpolarisierende Rechteckstimpulse verschiedener Intensität ( $-4,3 \text{ nA} - +4,3 \text{ nA}$ ) eine Reihe von Auffälligkeiten. Abhängig vom Alter der Tiere nach Hörbeginn zeigten sich dabei deutliche Unterschiede in der Spannungscharakteristik der Neurone (Abb. 33a-c).

Hyperpolarisierende Strompulse zunehmender Intensität führten in allen untersuchten Neuronen zu einer zweiphasigen Spannungsantwort. Wird die Amplitude der Spannungsantwort unmittelbar am Beginn des Strompulses gemessen, so zeigte sich zwischen Strom und Spannung eine annähernd lineare Beziehung (offene Kreise, Abb. 33a-c). Mit einer gewissen Verzögerung jedoch, zeigte sich in den Antworten eine depolarisierende Verschiebung der Spannung über der Membran zu weniger hyperpolarisierten Potentialen, also in Richtung des Ruhemembranpotentials. Diese einwärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms („inward rectification“, IWR) erreichte nach einer vom Alter der Tiere abhängigen Zeitspanne einen stationären Zustand (gefüllte Quadrate, Abb. 33a-c). Bei einer einwärts gerichteten Gleichrichtung des Stroms werden durch den hyperpolarisierenden Strompuls zum Zellinneren gerichtete Leitfähigkeiten positiver Ionen ( $\text{Na}^+ / \text{K}^+$ ) aktiviert, wodurch sich der Eingangswiderstand der Neurone durch eine Zunahme der Leitfähigkeit verringert. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei diesem hyperpolarisationsaktivierten Strom um den schon in Octopuszellen des PVCN (Golding et al. 1999) beschriebenen, sogenannten  $I_h$  – Strom. Die Verringerung des Eingangswiderstandes führt nach  $U = R \cdot I$  zu einer geringeren Spannungsänderung über der Membran. Die einwärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms wirkt, vereinfacht gesagt, dem Strompuls entgegen und verschiebt das Membranpotential wieder mehr in Richtung des Ruhepotentials. In der graphischen Darstellung der Strom – Spannungsbeziehung

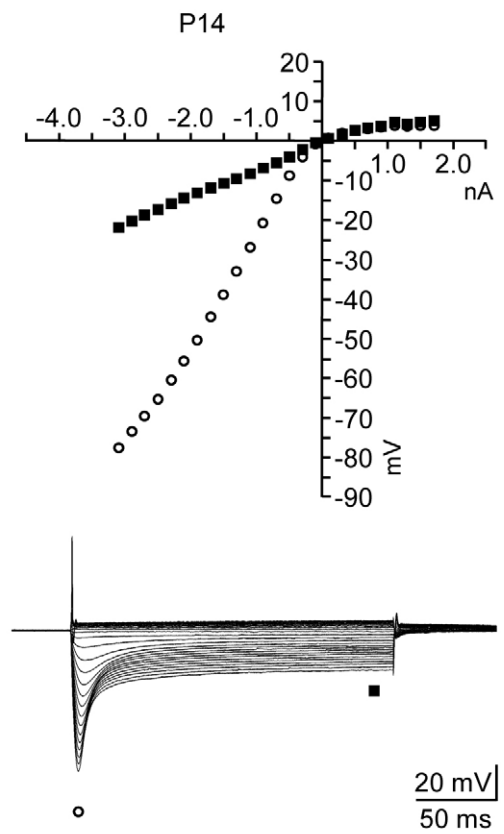
zeigte sich dies in einer nichtlinearen Anordnung der Messpunkte (gefüllte Quadrate, Abb. 33a-c). Durch die, mit steigender Intensität des Strompulses verstärkte Aktivierung der oben genannten Leitfähigkeiten lagen die Messpunkte der Spannung im stationären Bereich (gefüllte Quadrate, Abb. 33a-c) mehr in Richtung des Ruhepotentials der Zellen verschoben. Je nach Alter der Tiere war die Stärke der beobachteten einwärts gerichteten Gleichrichtung des Stroms unterschiedlich. Bei Neuronen von Tieren am Hörbeginn (P12, Abb. 33a) folgte die Amplitude der Spannung den Strompulsen steigender Intensität zu Beginn der Pulse linear (offene Kreise, Abb. 33a). Mit einer Verzögerung von 75 – 98 ms ( $n = 3$ ) konnte dann eine leichte IWR in der Spannungsantwort beobachtet werden (gefüllte Quadrate, Abb. 33a). Diese war jedoch im Vergleich zu P14- und P17-Neuronen noch sehr gering. Zellen von P14-Tieren zeigten am Beginn der Pulse ebenfalls eine lineare Zunahme der Spannungsantwort (offene Kreise, Abb. 33b). Mit einer im Vergleich zu P12-Zellen merklich geringeren Verzögerung von 41 / 64 ms ( $n = 2$ ) konnte dann jedoch eine deutliche IWR in der Spannungsantwort beobachtet werden (gefüllte Quadrate, Abb. 33b). Damit zeigten P14-Neurone fast schon die Charakteristika wie sie auch die am weitesten entwickelten Neurone am Postnataltag 17 aufwiesen. Bei P17-Zellen war die einwärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms noch etwas stärker ausgeprägt als bei P14-Neuronen. Schon am Beginn der Strompulse (offene Kreise, Abb. 33c) war ein nichtlineares Verhalten der Spannungsantwort zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass die oben beschriebenen Leitfähigkeiten schon am Ruhepotential der Zellen aktiv waren und damit der Eingangswiderstand der Neurone bereits zu Beginn der Strompulse merklich reduziert war. Mit einer, in drei von vier Zellen, weiter verkürzten Verzögerungszeit von 32 – 49 ms ( $n = 3$ ) konnte dann im stationären Bereich eine nochmals weiter verstärkte einwärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms beobachtet werden (gefüllte Quadrate, Abb. 33c). Eine P17- und eine P15-Zelle wiesen eine unübliche Verzögerungszeit von 114 ms (P17) und 121 ms (P15) auf. Ansonsten zeigten die nicht in Abb. 33 dargestellten Zellen von P15- und P16-Tieren ein zu P17-Neuronen analoges Verhalten.

Depolarisierende Strompulse zunehmender Intensität führten bei Neuronen älterer Tiere (P14 – P17) ebenfalls zu einer nichtlinearen Veränderung in der Spannungsantwort (Abb. 33b,c). Aus dem Verhalten der Spannung lässt sich dabei eine markante auswärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms („outward rectification“, OWR) ableiten. Bei einer auswärts gerichteten Gleichrichtung des Stroms werden durch den depolarisierenden Strompuls aus Sicht der Zelle nach außen gerichtete Leitfähigkeiten für Kaliumionen aktiviert. Analog zur oben genannten IWR verringert sich dabei der Eingangswiderstand der Neurone in Abhängigkeit von der Stärke der Leitfähigkeit deutlich.

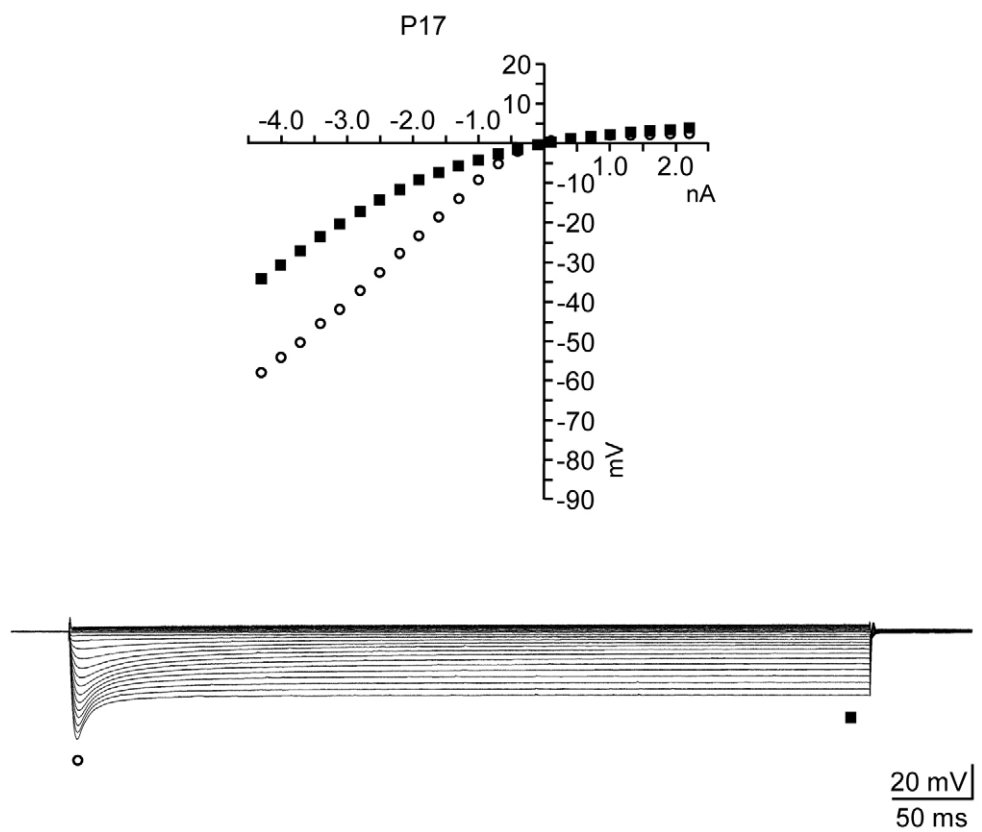
**a**



**b**



**c**



Die Verringerung des Eingangswiderstandes führte auch hier zu einer, in Relation zur Veränderung der Stromstärke, deutlich geringeren Spannungsänderung über der Membran. Bei den jüngsten und damit am wenigsten entwickelten Neuronen von Tieren am Hörbeginn (P12) war noch keine erkennbare OWR in der Spannungsantwort auf depolarisierende Strompulse zunehmender Intensität zu beobachten. Die Messpunkte der Spannung zeigten einen praktisch linearen Amplitudenanstieg mit Verdopplung der Stromstärke (Abb. 33a). Dies war unabhängig vom Zeitpunkt der Messung, am Beginn (offene Kreise, Abb. 33a) oder Ende (gefüllte Quadrate, Abb. 33a) der Strompulse. Dies weist auf einen, im Vergleich zu älteren Tieren, relativ hohen Eingangswiderstand hin (s.h. Kapitel 4.4.2.2), d.h. im Bereich um das Ruhepotential der Zellen (Nullpunkt in Abb. 33a) waren generell nur wenige, vermutlich für Kaliumionen passierbare Leitfähigkeiten geöffnet, bzw. es wurden nur wenige dieser Leitfähigkeiten durch die Strompulse aktiviert. Im Gegensatz zu P12-Neuronen, konnte bei zwei Tage älteren Tieren (P14) bereits eine deutliche OWR in der Spannungsantwort beobachtet werden. Mit einer nur sehr geringen Änderung der Spannungsamplitude bei einer Verdopplung der Stromstärke lagen sowohl die Messpunkte am Beginn (offene Kreise, Abb. 33b) als auch am Ende der Pulse (gefüllte Quadrate, Abb. 33b) nahe zum Ruhepotential (Nullpunkt in Graphik, Abb. 33b).

---

### **Abbildung 33:** Strom – Spannungsbeziehung (I / V-Kurven) der MSO-Neurone

Zur Bestimmung der intrinsischen elektrophysiologischen Eigenschaften sind die Antworten von MSO-Neuronen aus drei Altersstufen (a P12; b P14; c P17) auf schrittweise veränderte Rechteckstrompulse (-4,3 – +4,3 nA) dargestellt (Spannungsspuren). Die Graphiken zeigen die sich aus den jeweiligen Zellantworten ergebenden Strom – Spannungsbeziehungen am Beginn (○) und in der stationären Phase der Spannungsantwort (■). **(a)** P12-Neurone (Hörbeginn) zeigen in Antwort auf depolarisierende Strompulse einen linearen Amplitudenanstieg der Spannung mit Verdopplung der Stromstärke, was auf einen hohen Eingangswiderstand hinweist. Auf hyperpolarisierende Strompulse antworten P12-Zellen am Beginn der Pulse mit einer linearen Spannungsänderung (○). Nach einer vergleichsweise langen Verzögerung (79 ms) zeigt sich eine noch geringe IWR, erkennbar als depolarisierende Spannungsverschiebung im Stationärbereich (■). **(b)** P14-Neurone zeigen in Antwort auf depolarisierende Strompulse eine markante OWR. Auf hyperpolarisierende Strompulse antworten die P14-Zellen zunächst ebenfalls mit einer linearen Spannungsänderung (○), nach einer geringen Verzögerung (41 ms) zeigt sich im Stationärbereich eine deutliche IWR (■). **(c)** P17-Neurone antworten auf depolarisierende Strompulse mit einer sehr starken OWR. Hyperpolarisierende Strompulse führen bei P17-Zellen bereits am Beginn der Pulse (○) zu einer markanten IWR, die sich nach geringer Verzögerung (37 ms) im Stationärbereich nochmals verstärkt (■). Bereits am Ruhepotential sind bei P17-Zellen einwärts wie auswärts gerichtete Leitfähigkeiten aktiv.

Auf überschwellige depolarisierende Strompulse antworten MSO-Neurone aller Altersstufen mit nur einem Aktionspotential am Beginn der Pulse (a,b „onset“-Typ). Einige Zellen zeigen nach dem Abschalten hyperpolarisierender Strompulse ein sog. „offset“-Aktionspotential (a). Aufgrund der starken OWR wird selbst bei maximaler Stromstärke nicht in allen Zellen die Feuerschwelle erreicht (c).

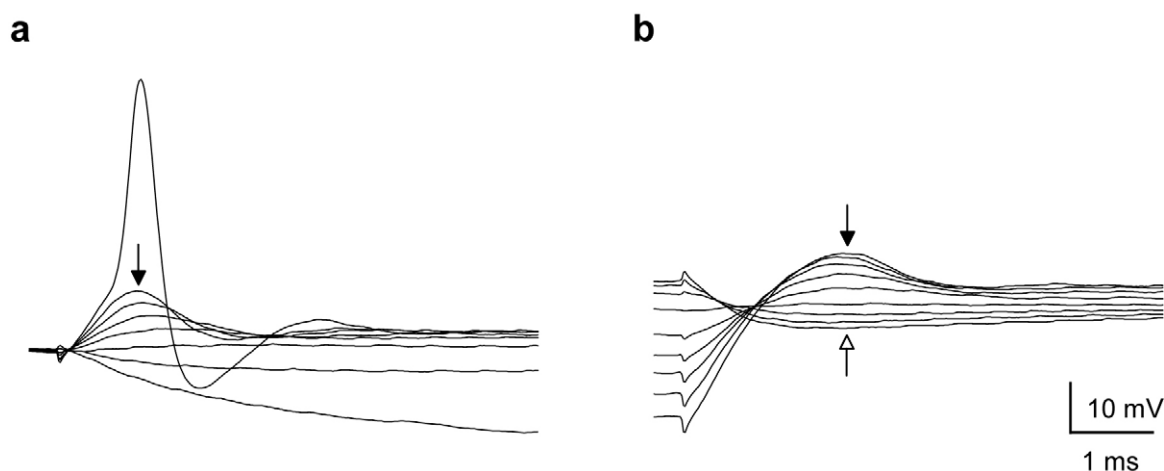
---

Der auffallend flache Anstieg der Kurve deutet zudem darauf hin, dass die Leitfähigkeiten schon unmittelbar im Bereich um das Ruhepotential aktiv sind. Bei den ältesten der untersuchten Neurone, fünf Tage nach Hörbeginn (P17), war eine im Vergleich zu P14-Zellen noch etwas stärkere OWR in der Spannungsantwort feststellbar (Abb. 33c). Durch mehr oder stärker aktivierte Leitfähigkeiten war der Eingangswiderstand nochmals weiter reduziert. Eine Verdopplung der Stromstärke führte bei P17-Zellen sowohl am Beginn (offene Kreise, Abb. 33c) als auch am Ende der Strompulse (gefüllte Quadrate, Abb. 33b) zu einer äußerst geringen Änderung der Spannungsamplitude. Die Kurve lag bis zu einer injizierten Stromstärke von über 2 nA sehr nahe am Ruhepotential der Zellen. Wie bei P14-Zellen, so weist dies auch bei P17-Zellen auf eine Aktivierung von Leitfähigkeiten am Ruhepotential der Zellen hin. Die nicht in Abb. 33 dargestellten Zellen von P15- und P16-Tieren zeigten ein zu P17-Neuronen analoges Verhalten in ihrer Spannungsantwort auf depolarisierende Strompulse.

Die durch die OWR bedingte Verringerung im Eingangswiderstand der Zellen erforderte bei P14 – P17-Zellen sehr hohe Stromstärken ( $> 1,5$  nA) um ein Aktionspotential in den Zellen auszulösen. Doch selbst mit sehr hohen Stromstärken von bis zu 4,3 nA konnte nicht in allen P12 – P17-Zellen ein Aktionspotential ausgelöst werden. In den Fällen, in denen das Auslösen eines Aktionspotentials möglich war, antworteten die Zellen immer mit nur einem Aktionspotential am Beginn des Strompulses („onset“-Typ). Die ausgehend von ihrer Basis zum Maximum gemessene Amplitude der Aktionspotentiale war dabei in Zellen der Altersstufen P12 – P15 mit 53,2 mV (P12) – 44,4 mV (P15) ( $n = 6$ ) klein (Abb. 33, 34). In je einer P16- und P17-Zelle konnte jedoch eine nochmals verringerte Aktionspotentialamplitude von 33,9 mV (P16) und als Minimum der untersuchten Population 15,6 mV (P17) festgestellt werden. Die an der Basis der Aktionspotentiale gemessene Gesamtzeitdauer verkürzte sich ebenfalls mit zunehmendem Alter nach Hörbeginn. Während die Aktionspotentialdauer bei P12-Neuronen noch bei 1,05 bzw. 0,97 ms ( $n = 2$ ) lag, zeigten P14 – P17-Neurone mit 0,84 – 0,56 ms ( $n = 6$ ) eine merklich verkürzte Zeitdauer des Aktionspotentials (Abb. 34).

Bei der Stimulation mit unterschwelligen depolarisierenden Strompulsen zeigte sich, unabhängig vom Alter, in allen untersuchten MSO-Neuronen eine schnelle Spannungstransiente (1,0 – 1,4 ms Dauer), die deutlich in den Spannungsspuren abzulesen war (Pfeil, Abb. 34a). Die Amplituden dieser Spannungstransienten skalierten sich dabei mit der Stromstärke der Pulse und konnten kurz vor der Aktionspotentialschwelle eine Amplitude von ca. 10 – 20 mV erreichen. Nach dem Abschalten der Strompulse zeigten sich in allen Zellen, der Polarität der Strompulse entgegengesetzte, bezogen auf das

Ruhepotential der Zellen hyperpolarisierende (offener Pfeil, Abb. 34b) oder depolarisierende Nachpotentiale (gefüllter Pfeil, Abb. 34b). Auch die Amplituden der Nachpotentiale skalierten sich mit der Stromstärke der vorangegangenen Strompulse.



**Abbildung 34:** Spannungstransiente und Nachpotentiale

Vergrößerte Ausschnitte von Spannungsantworten der P14-Zelle aus Abb. 33b am Beginn (a) und unmittelbar nach Abschalten der Strompulse (b). **(a)** Unterschwellige Antworten auf depolarisierende Strompulse zunehmender Intensität zeigen bei MSO-Neuronen charakteristische Spannungstransienten am Beginn der Strompulse (Pfeil). Das überschwellige Aktionspotential der P14-Zelle ist relativ klein (38 mV) und kurz (0,56 ms). **(b)** Nach Abschalten der Strompulse zeigen sich der Polarität der Strompulse entgegengesetzte hyperpolarisierende (offener Pfeil) oder depolarisierende (gefüllter Pfeil) Nachpotentiale. Die Amplitude der Nachpotentiale skaliert sich mit der Stromstärke der Pulse, nach hyperpolarisierenden Strompulsen hoher Intensität kann die Amplitude des depolarisierenden Nachpotentials z.T. die Feuerschwelle überschreiten und ein „offset“-Aktionspotential auslösen (s.h. Abb. 33a).

Die depolarisierenden Nachpotentiale, welche hyperpolarisierenden Strompulsen folgten, waren dabei meist prominenter und erreichten Amplituden von bis zu ca. 13 mV bei einer Dauer von ca. 2 ms. In zwei Neuronen (P12 / P16) erreichte die Amplitude des depolarisierenden Nachpotentials nach dem Abschalten eines hyperpolarisierenden Strompulses hoher Intensität (P12: -650 pA / P16: -2300 pA) die Feuerschwelle und löste ein Aktionspotential aus (sog. „offset“-Aktionspotential; Abb. 33a). Die „offset“-Aktionspotentiale unterschieden sich bei beiden Zellen in ihrer Amplitude und Dauer nur sehr wenig von den jeweiligen Aktionspotentialen am Beginn der Pulse (P12: Beginn: 48,1 mV / 1,05 ms; „offset“: 43,4 mV / 1,08 ms; P16: Beginn: 33,9 mV / 0,58 ms; „offset“: 35,5 mV / 0,65 ms).

Die Untersuchung der Entwicklung von intrinsischen Eigenschaften der MSO-Neurone zeigte innerhalb der ersten fünf Tage nach Hörbeginn (P12) eine prägnante Verringerung im Eingangswiderstand und der passiven Membranzeitkonstante in Abhängigkeit vom Alter der Tiere. Zudem entwickelte sich innerhalb dieser Zeitspanne

eine prominente IWR sowie OWR in den MSO-Neuronen, was entweder auf eine verstärkte, oder *de novo* entstandene Aktivität von Natrium- und Kaliumionen-Leitfähigkeiten hinweist. Dabei scheint der Hauptentwicklungsschritt, mit den deutlichsten Änderungen im Verhalten der Neurone, innerhalb einer Zeitspanne von nur zwei Tagen nach Hörbeginn (P12 – P14) vollzogen zu werden. Innerhalb weiterer drei Tage, bis zum Postnataltag 17, konnten keine weiteren starken Veränderungen der oben genannten Parameter beobachtet werden. Im Ruhemembranpotential und in der Membrankapazität konnten dagegen keine altersabhängigen Veränderungen festgestellt werden.

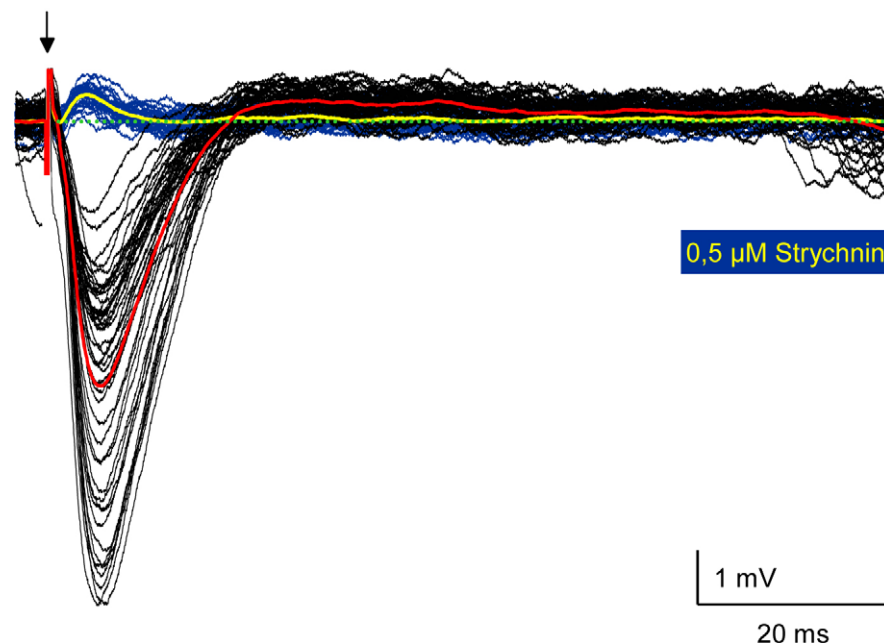
#### **4.4.3 Entwicklungsabhängige Veränderungen im Zeitverhalten der synaptisch evozierten, inhibitorischen Potentiale und Ströme**

Das Zeitverhalten der synaptisch evozierten, inhibitorischen Potentiale (IPSPs) und Ströme (IPSCs) wurde an identifizierten MSO-Neuronen der Altersstufen P14 – P17 untersucht. Postnataltag 14 wurde als Ausgangspunkt für die Untersuchung der Entwicklung der inhibitorischen synaptischen Eigenschaften gewählt, da die Entwicklung der intrinsischen Eigenschaften bei dieser Altersstufe schon weitgehend abgeschlossen erschien. Dies war von Vorteil, da Veränderungen im Zeitverhalten der synaptischen Antworten, speziell der IPSPs, nun besser im Zusammenhang mit der Entwicklung einer räumlichen Beschränkung der glycinergen Synapsen analysiert werden konnten. Effekte von entwicklungsabhängigen Veränderungen der intrinsischen Eigenschaften auf das Zeitverhalten der synaptischen Antworten konnten so minimiert werden.

Zur synaptischen Stimulation der MSO-Neurone in den verschiedenen Altersgruppen (P14 – P17) wurde eine monopolare Stimulationselektrode im Faserbündel zwischen MNTB und MSO platziert. Durch die Position der Stimulationselektrode wurden sowohl Axone von MNTB, als auch von AVCN-Neuronen aktiviert (Abb. 9), was zu einer gemischten Antwort aus EPSPs / IPSPs oder EPSCs / IPSCs führte. Um die monosynaptischen, inhibitorischen, glycinergen Antworten zu isolieren wurden deshalb postsynaptische AMPA- und NMDA-Rezeptoren mit kompetitiven und nicht kompetitiven Antagonisten pharmakologisch blockiert (s.h. Kapitel 3.2.4.3; Tab. 15). Um das Zeitverhalten der IPSCs genau analysieren zu können, und mögliche Veränderungen durch spannungsgesteuerte Natriumkanäle sowie hyperpolarisations-induzierte Kationenkanäle ( $I_h$ ) auszuschließen, wurden diese Leitfähigkeiten ebenfalls pharmakologisch blockiert. Obwohl keine Hinweise vorlagen, dass GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren an MSO-Zellen der untersuchten Altersstufen in signifikanter Anzahl vorkommen, wurden eventuell



vereinzelt vorkommende postsynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren pharmakologisch blockiert. Die so isolierten IPSPs und IPSCs waren damit rein glycinerg und konnten durch Zugabe von Strychnin (0,5  $\mu$ M), eines spezifischen Glycinrezeptorantagonisten, vollständig blockiert werden (Abb. 35).



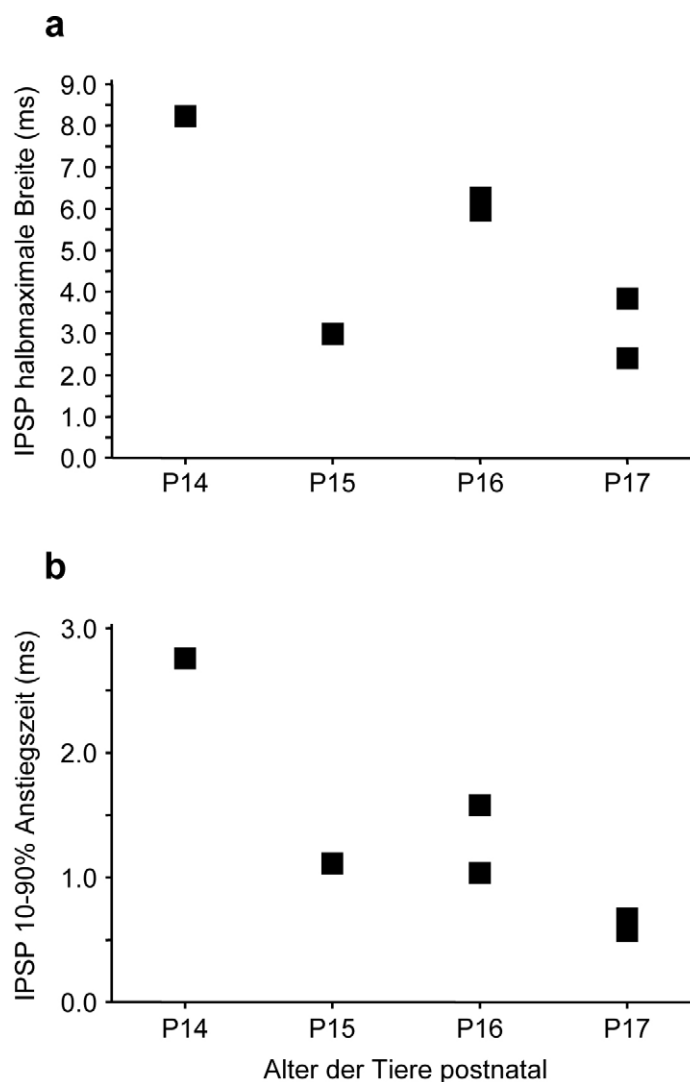
**Abbildung 35:** IPSPs von MSO-Neuronen sind glycinerg

Die durch Stimulation der MNTB-Fasern in Gegenwart von AMPA- und NMDA-Antagonisten (DNQX: 10  $\mu$ M; APV: 50  $\mu$ M) synaptisch evozierten IPSPs eines P14-MSO-Neurons (schwarze Spuren: einzelne IPSPs; rote Spur: gemittelt IPSP) werden durch Zugabe des spezifischen Glycinrezeptorantagonisten Strychnin (0,5  $\mu$ M) vollständig blockiert (blaue Spuren: einzelne Zellantworten; gelbe Spur: gemittelte Zellantwort). In den Strychninspuren sind noch Rest-EPSPs zu erkennen (nach oben gerichtete Auslenkungen), bedingt vermutlich durch nicht vollständig blockierte NMDA-Rezeptoren. Auffällig ist die leichte Depolarisation nach dem Abklingen der Kontroll-IPSPs, die unter Strychnin nicht zu erkennen ist. Pfeil: Stimulusartefakt (abgeschnitten); gestrichelte Linie: Ruhepotential

#### 4.4.3.1 Inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSPs)

Die von MSO-Neuronen im Alter zwischen P14 und P17 aufgenommenen IPSPs zeigten in ihrer Kinetik erkennbar entwicklungsabhängige Veränderungen. Zur Charakterisierung der Kinetik der IPSPs in den verschiedenen Altersstufen nach Hörbeginn wurden die Zeitdifferenz zwischen Anstieg und Abklingen des IPSPs am 50% Punkt der maximalen Amplitude (halbmaximale Breite, HMB) und die Zeit in der die Amplitude des IPSPs von 10% auf 90% anstieg (10 – 90% Anstiegszeit) analysiert (Abb. 36). Trotz einer geringen Anzahl an untersuchten Zellen pro Altersstufe, zeichnete sich von P14 zu P17 eine Tendenz zu einer Beschleunigung der IPSP-Kinetik mit zunehmendem Alter nach Hörbeginn ab. Die IPSPs mit der langsamsten Kinetik der untersuchten Population von

MSO-Zellen konnten bei der jüngsten analysierten Zelle am Postnataltag 14 gefunden werden (Abb. 36a,b; schwarze Spuren Abb. 37a). Das gemittelte IPSP dieser Zelle (rote Spur, Abb. 37a) zeigte mit einer HMB von 8,23 ms (Abb. 36a) nicht nur die längste Zeitdauer sondern mit 2,76 ms auch die langsamste 10 – 90% Anstiegszeit (Abb. 36b) aller untersuchten IPSPs.

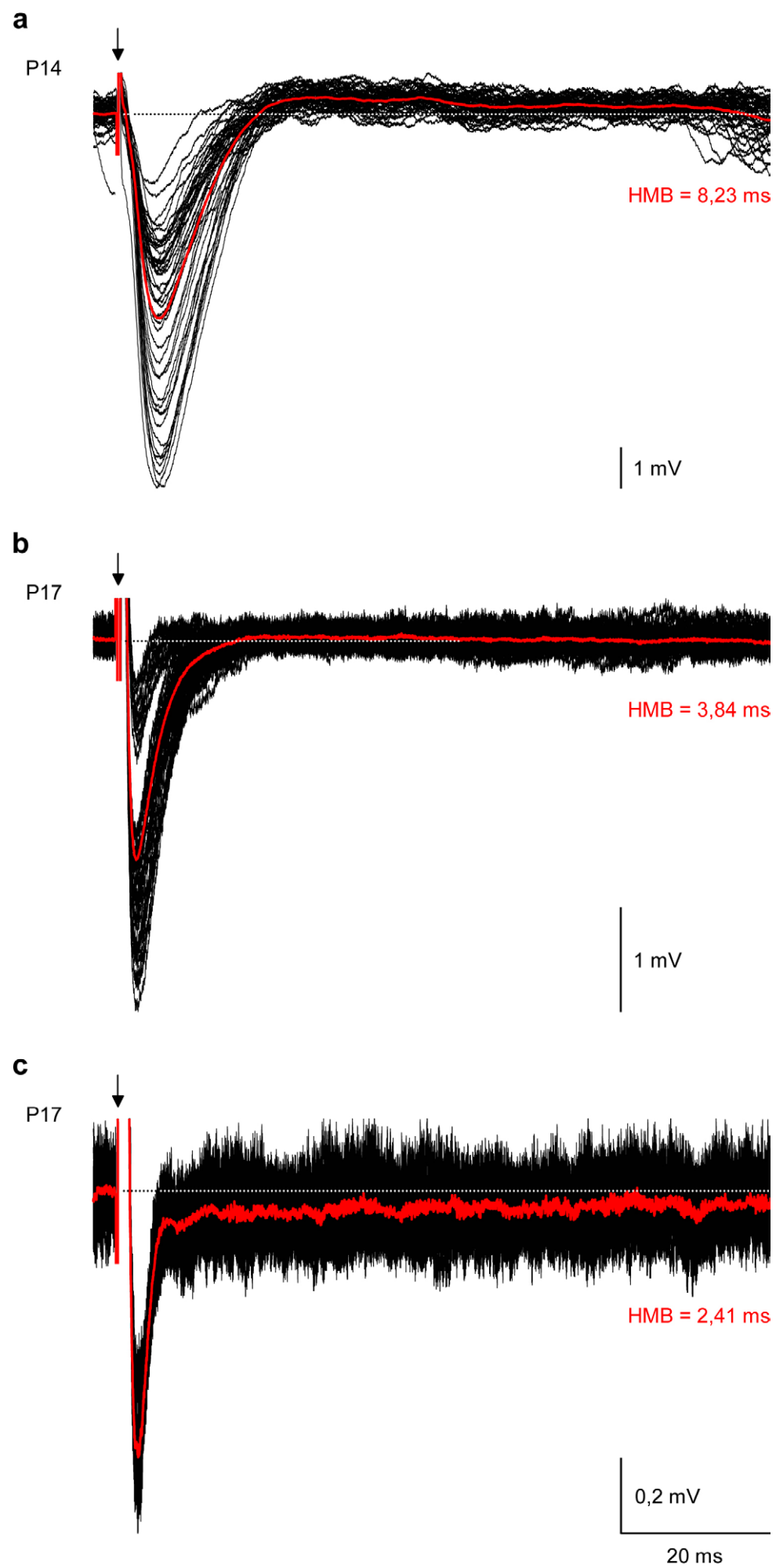


**Abbildung 36:** Kinetik der IPSPs von MSO-Neuronen

Die Graphik zeigt die beiden untersuchten Kinetikparameter, halbmakimale Breite (HMB, a) und 10 – 90% Anstiegszeit (b) für die gemittelten IPSPs der einzelnen analysierten MSO-Neurone (■) aus den untersuchten Altersstufen. **(a)** In der Länge der HMB der IPSPs zeigt sich ein, trotz der geringen Anzahl an analysierten Zellen, erkennbarer Trend zu einer Verkürzung der IPSPs mit zunehmendem Alter / Hörerfahrung der Tiere nach Hörbeginn. Während die P14-Zelle eine vergleichsweise lange HMB aufweist, sind bei drei Tage älteren Zellen (P17) bereits über 50% kürzere HMBs erkennbar. P15- und P16-Zellen liegen zwischen beiden Extremen. **(b)** Auch in der Verteilung der 10 – 90% Anstiegszeiten ist ein Trend zu einer Beschleunigung mit zunehmendem Alter erkennbar. Von P14 zu P17 reduziert sich die Anstiegszeit der IPSPs um über 75%. Die Anstiegszeiten der P15- und P16-IPSPs liegen dabei schon im Bereich der P17-Zellen.

Bei Zellen drei Tage älterer Tiere (P17), die bereits über mehr Hörerfahrung verfügen, war bereits eine z.T. deutlich schnellere Kinetik der IPSPs zu beobachten (Abb. 36a,b; schwarze Spuren Abb. 37b,c). So zeigte das gemittelte IPSP einer der beiden P17-Zellen (rote Spur, Abb. 37c) eine deutlich verkürzte HMB von 2,41 ms (Abb. 36a) und eine sehr kurze 10 – 90% Anstiegszeit von nur 0,57 ms (Abb. 36b). Damit wies diese P17-Zelle die IPSPs mit der schnellsten Kinetik der untersuchten Population auf (Abb. 36a,b). Die IPSPs der zweiten P17-Zelle (schwarze Spuren, Abb. 37b) waren ebenfalls merklich kürzer als die IPSPs der P14-Zelle (schwarze Spuren, Abb. 37a). Allerdings zeigte das gemittelte IPSP dieser P17-Zelle (rote Spur, Abb. 37b), im Vergleich zum gemittelten IPSP der anderen P17-Zelle (rote Spur, Abb. 37c), bei einer ebenso schnellen 10 – 90% Anstiegszeit (0,67 ms; Abb. 36b) eine längere HMB (3,84 ms; Abb. 36a) und damit eine etwas langsamere Kinetik im Abklingen der Potentiale (Abb. 37b,c). Die Kinetik der IPSPs in den Altersstufen P15 und P16 war eher variabel. So zeigte die untersuchte P15-Zelle, im Vergleich zu der einen Tag jüngeren P14-Zelle, bereits sehr kurze IPSPs. Das gemittelte P15-IPSP lag in allen untersuchten Parametern der Kinetik (Abb. 36a,b) fast auf dem Niveau der schnellsten Zelle am Postnataltag 17 (P15: HMB = 2,99 ms; 10 – 90% Anstiegszeit = 1,11ms). Die IPSPs der beiden am Postnataltag 16 untersuchten Zellen zeigten dagegen unterschiedliche Ergebnisse in den untersuchten Kinetikparametern. Einerseits deuteten die vergleichsweise langen halbmaximalen Breiten der gemittelten IPSPs (6,27 / 5,95 ms; Abb. 36a) auf eine eher langsame Kinetik des Potentialabfalls hin, während andererseits beide gemittelten P16-IPSPs in ihren 10 – 90% Anstiegszeiten (1,58 / 1,04 ms; Abb. 36b) bereits erkennbar schneller waren als das gemittelte IPSP der P14-Zelle. Mit ihren Anstiegszeiten lagen die beiden gemittelten P16-IPSPs damit auf Höhe des gemittelten P15-IPSPs und nahe dem Bereich der beiden gemittelten P17-IPSPs.

Die Beschleunigung der Kinetik war auch im Vergleich der Spuren der einzelnen (schwarze Spuren, Abb. 37a-c) und gemittelten (rote Spuren, Abb. 37a-c) Potentialverläufe von P14- und P17-Zellen erkennbar. Die schnellere Anstiegszeit zum Maximum, die geringere Gesamtzeitdauer und die Beschleunigung des Abklingens resultierte bei den IPSPs der beiden P17-Zellen (Abb. 37b,c), im Vergleich zu den IPSPs der P14-Zelle (Abb. 37a), in merklich verkürzten und damit zeitlich präziseren Potentialen. Zusätzlich fällt bei der Betrachtung der einzelnen IPSPs der P14- und P17-Zellen (schwarze Spuren, Abb. 37a-c) auf, dass die P17-Zelle mit der schnellsten IPSP-Kinetik der untersuchten Population (Abb. 37c) auch qualitativ die geringste zeitliche Variabilität im Anstieg und Abklingen zwischen den einzelnen evozierten IPSPs aufwies.



Wie aus Abb. 37c hervorgeht, liegen alle IPSPs innerhalb eines engen Zeitraums, was auf eine nahezu identische Kinetik der einzelnen IPSPs hinweist. Dagegen zeigten die P14- (schwarze Spuren, Abb. 37a) und die zweite P17-Zelle (schwarze Spuren, Abb. 37b), deren gemittelte IPSPs eine langsamere Kinetik aufwiesen, qualitativ auch eine etwas höhere zeitliche Variabilität in der ansteigenden und abfallenden Flanke zwischen den einzelnen IPSPs. Besonders auffällig war diese zeitliche Variabilität bei den IPSPs der P14-Zelle, welche die langsamste Kinetik der untersuchten Population zeigten.

Eine absolute Analyse der IPSP-Amplituden wurde nicht durchgeführt, da die absolute Amplitude der IPSPs neben der Zusammensetzung der internen Elektrodenlösung auch von schwer oder während der Experimente gar nicht zu kontrollierenden externen Faktoren wie der Stimulusstärke und dem Zustand der Dendriten abhängig war. So könnte ein, während dem Anfertigen der Schnitte, distal verletzter Dendrit zu einer geringeren Amplitude der IPSPs führen. Wie die P14-Zelle (Abb. 37a) und eine P17-Zelle (Abb. 37b) zeigen, konnten die IPSPs innerhalb einer Zelle in ihrer Amplitude relativ zueinander eine beträchtliche Variabilität aufweisen. Ob jedoch zwischen der Variabilität der IPSP-Amplituden einer Zelle und der Kinetik der Potentiale ein Zusammenhang besteht, ist aufgrund der wenigen untersuchten Zellen und der oben erwähnten Unsicherheiten bezüglich der tatsächlichen Größe der IPSPs nur schwer einzuschätzen.

---

### Abbildung 37: IPSPs von P14- und P17-MSO-Neuronen

**(a)** Die synaptisch evozierten IPSPs der P14-Zelle (schwarze Spuren: einzelne IPSPs; rote Spur: gemitteltes IPSP) weisen eine eher langsame Kinetik auf. Im Anstieg und Abklingen der einzelnen IPSPs ist qualitativ eine auffallende zeitliche Variabilität erkennbar. Die Amplituden der einzelnen IPSPs weisen ebenfalls eine merkliche Variabilität auf. **(b,c)** Die IPSPs der beiden P17-Zellen (schwarze Spuren: einzelne IPSPs; rote Spuren: gemittelte IPSPs) zeigen in ihrem Verlauf eine erkennbar schnellere Kinetik als die P14-IPSPs. Besonders deutlich zeigt sich dies an den kürzesten IPSPs der untersuchten Population (c). Diese P17-Zelle (c) zeigt im Vergleich zur zweiten P17-Zelle (b) und zur P14-Zelle (a) qualitativ eine geringe zeitliche Variabilität im Anstieg und Abklingen zwischen den einzelnen Potentialen sowie eine geringe Amplitudenvariabilität. Bedingt durch ihre vergleichsweise kleinen Amplituden sind die einzelnen IPSPs in (c) stark vergrößert dargestellt, daher ist in den einzelnen Spuren das intrinsische Rauschen der Signale überproportional deutlich zu erkennen.

Nach Abklingen der IPSPs wird nur in wenigen Zellen das Ruhepotential (gestrichelte Linie) sofort wieder erreicht (b), wahrscheinlich bedingt durch eine hyperpolarisations-induzierte Aktivierung intrinsischer Leitfähigkeiten wird es häufig leicht über- (a) oder unterschritten (c), die Potentialspuren erreichen daher erst lang nach dem Abklingen der IPSPs wieder den Nullwert. Der angegebene Wert der HMB wurde am gemittelten IPSP der jeweiligen Zelle (rote Spuren) bestimmt.

Pfeil: Stimulusartefakt (abgeschnitten)

---

Eine weitere Auffälligkeit war die Tendenz der Spannung nach dem Abklingen des Potentials nicht sofort wieder auf das Niveau des Ruhepotentials zurückzukehren, sondern dieses zunächst entweder zu über- oder unterschreiten (Abb. 35, 37a,c). Erst mit einer relativ langen Verzögerung (30 – 100 ms) erreichte die Spannung wieder das Ruhepotential (gestrichelte Linie, Abb. 35, 37a,c). Es ist dabei relativ unwahrscheinlich, dass die Spannungsänderung durch einen vom IPSP unabhängigen Mechanismus, wie z.B. einer Verschlechterung des physiologischen Zustandes der Zellen durch die PCL-Ableitung entstand. Wie aus Abb. 35 hervorgeht, zeigten die Potentiale der Zelle nach Abklingen der IPSPs (schwarze Spuren, rote Spur, Abb. 35) eine leichte Depolarisierung, die nach der später durchgeführten Blockierung des IPSPs durch die Applikation von Strychnin nicht mehr erkennbar war (blaue Spuren, gelbe Spur, Abb. 35). Dieses Verhalten der Spannung deutet daher eher auf eine hyperpolarisations-induzierte Aktivierung von intrinsischen Leitfähigkeiten hin. Möglicherweise wurde durch die Hyperpolarisation der Zelle die in Kapitel 4.4.2.3 beschriebene IWR ausgelöst. Die Aktivierung dieser intrinsischen Leitfähigkeiten bei Ableitungen im CC-Modus ist allerdings für eine exakte Bestimmung der Kinetik von synaptisch vermittelten Leitfähigkeitsänderungen ungünstig, denn durch eventuell langsamere Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung von Natrium- und Kaliumionen-Leitfähigkeiten könnte die reine Kinetik der synaptischen Potentiale (vorallem in der abklingenden Phase des Potentials) „verschmiert“ werden. Der Vergleich zwischen dem gemittelten IPSP und IPSC einer am Postnataltag 17 abgeleiteten Zelle (IPSP: Abb. 37b) legte einen solchen Effekt der intrinsischen Leitfähigkeiten auf die Kinetik der Potentiale nahe. Während das gemittelte IPSP eine relativ langsame Kinetik zeigte (HMB = 3,84 ms; 10 – 90% Anstiegszeit = 0,67 ms; Abb. 36a,b), war das gemittelte IPSC der Zelle, welches unter gleichen Bedingungen im VC-Modus aufgenommen wurde, mit einer halbmaximalen Breite von 1,27 ms erheblich schneller ( $\tau_{\text{dec}} = 1,26$  ms; 10 – 90% Anstiegszeit = 0,25 ms; Abb. 38a,b).

Bedingt durch die elektrotechnischen Schaltkreise des CC-Modus, die den Strom über der Membran vorgeben und das Potential der Zellen variabel lassen, werden z.B. die treibenden Kräfte für Ionen sowie Ionenpumpen nicht kontrolliert. Es ist daher zwar möglich das Verhalten der Zellen in einem mehr physiologischen Kontext zu untersuchen, die einzelnen, den Potentialveränderungen zugrundeliegenden Ströme können aber nicht getrennt analysiert werden. Eine Trennung zwischen dem Einfluss intrinsischer Leitfähigkeiten und dem Effekt der Entwicklung räumlich beschränkter glycinерger Synapsen auf die Kinetik der inhibitorischen, synaptischen Potentiale war somit im CC-Modus nicht möglich. Um die Effekte der räumlichen Beschränkung glycinерger Synapsen

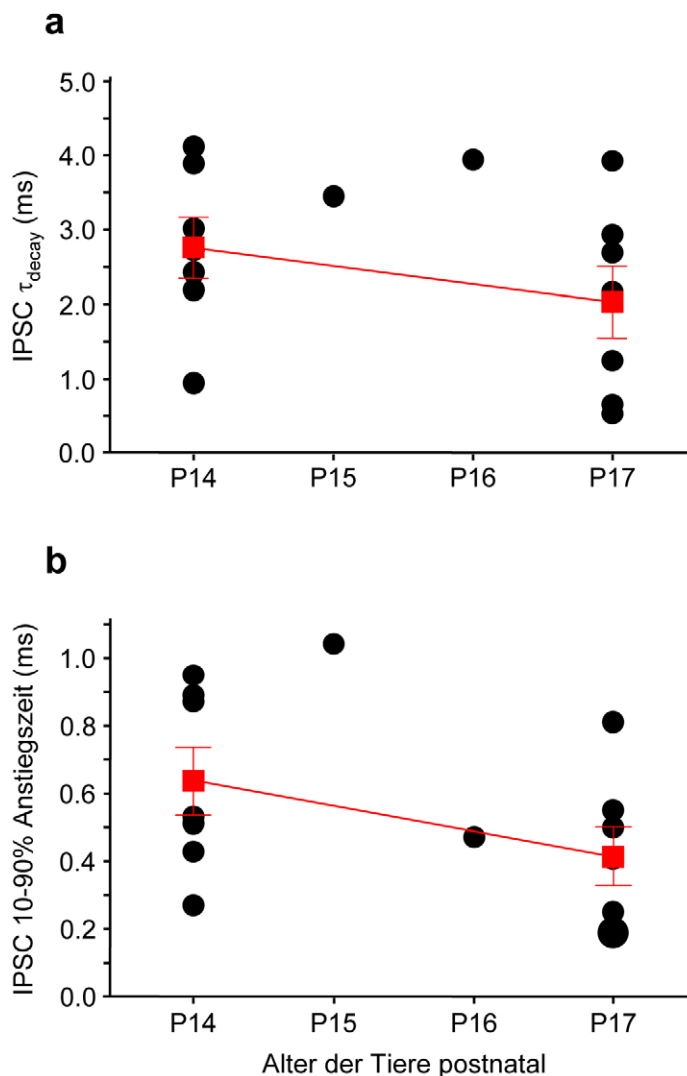
auf die Kinetik der inhibitorischen, synaptischen Übertragung isoliert von weiteren Strömen analysieren zu können, wurden die weiteren Experimente deshalb im VC-Modus durchgeführt. Durch die Analyse im VC-Modus konnten die in diesem Fall „störenden“ intrinsischen Leitfähigkeiten inaktiviert werden und es war möglich nur den, durch die Aktivierung von Glycinrezeptoren induzierten Strom (IPSC) getrennt zu untersuchen.

#### 4.4.3.2 Inhibitorische postsynaptische Ströme (IPSC)

Isolierte glycinerge IPSCs wurden in MSO-Neuronen von Tieren der Altersstufen P14 – P17 untersucht. Der Schwerpunkt der analysierten Zellen lag dabei auf den Postnataltagen 14 und 17, da die Analyse der IPSPs Grund zu der Annahme gab, dass durch die Entwicklung räumlich beschränkter glycinерger Synapsen bedingte Unterschiede am deutlichsten zwischen diesen beiden Altersstufen erkennbar sein sollten. Zur Charakterisierung der Kinetik der IPSCs in den untersuchten Altersstufen wurden hier die Zeitkonstante des exponentiellen Abklingens des Stroms ( $\tau_{\text{dec}}$ ) und die 10 – 90% Anstiegszeit der gemittelten IPSCs analysiert.

Das Zeitverhalten der gemittelten IPSCs zeigte sowohl bei P14, als auch bei P17-Zellen in beiden Parametern eine relativ hohe Variabilität (Abb. 38). Trotz dieser Variabilität war die Kinetik der IPSCs der am Postnataltag 17 untersuchten Neurone zum einen im Mittel etwas schneller als die Kinetik der IPSCs von P14-Zellen, zum anderen konnten bei P17-Zellen mehr IPSCs mit extrem schneller Kinetik festgestellt werden (Abb. 38). So lag der Mittelwert der Zeitkonstante des exponentiellen Abklingens bei P17-IPSCs mit  $2,03 \pm 0,48$  ms ( $n = 7$ ; Abb. 38a, P17 rotes Quadrat) zwar nur wenig aber trotzdem erkennbar niedriger als bei P14-IPSCs ( $2,76$  ms  $\pm$   $0,41$  ms;  $n = 7$ ; Abb. 38a, P14 rotes Quadrat). Während sich die IPSCs der meisten P14-Zellen (6 / 7; Abb. 38a, P14 schwarze Punkte) in einem Bereich relativ langsamer Zeitkonstanten ( $\tau_{\text{dec}}$ : 2,42 - 4,11 ms; Abb. 38a, 39a) gruppierten und nur eine Zelle ein deutlich verkürztes IPSC ( $\tau_{\text{dec}} = 0,94$  ms) zeigte, konnte bei P17-Zellen eher eine Zweiteilung in der Verteilung der Werte beobachtet werden (Abb. 38a, schwarze Punkte). Wobei die IPSCs des einen Teils der Zellen (4 / 7) mit relativ langsamen Zeitkonstanten ( $\tau_{\text{dec}}$ : 2,17 – 3,95 ms; Abb. 38a, 39b) im Bereich der P14-Population lagen. Der andere Teil (3 / 7 Zellen) allerdings zeigte sehr schnelle IPSCs (Abb. 39c) mit äußerst kurzen Zeitkonstanten ( $\tau_{\text{dec}}$ : 0,54 – 1,26 ms; Abb. 38a). Die IPSCs dieser drei Zellen hatten mit nur 0,19 ms (identisch in 2 Zellen; Abb. 38b, großer schwarzer Punkt) und 0,25 ms auch sehr schnelle 10 – 90% Anstiegszeiten (Abb. 38b). Die IPSCs der übrigen P17-Zellen (4 / 7) gruppierten sich wiederum in einem Bereich langsamerer 10 – 90% Anstiegszeiten (0,41 – 0,81 ms; Abb. 38b). Aufgrund dieser

Variabilität lagen die P17-IPSCs insgesamt zwar nicht Bereich sehr kurzer 10 – 90% Anstiegszeiten ( $0,41 \pm 0,09$  ms;  $n = 7$ ; Abb. 38b, rotes Quadrat), im Vergleich zu IPSCs drei Tage jüngerer P14-Zellen jedoch zeigten sie eine schon erkennbar schnellere Kinetik des Stromanstiegs (P14:  $0,64 \pm 0,1$  ms;  $n = 7$ ; Abb. 38b, rotes Quadrat).



**Abbildung 38:** Kinetik der IPSCs von MSO-Neuronen

Die Graphik zeigt die Verteilung der beiden untersuchten Kinetikparameter, Zeitkonstante des exponentiellen Abklingens ( $\tau_{\text{dec}}$ , a) und 10 – 90% Anstiegszeit (b) für die gemittelten IPSCs der einzelnen analysierten MSO-Neurone (●) aus den untersuchten Altersstufen. Für P14- und P17-IPSCs (je  $n = 7$ ) ist auch jeweils der Mittelwert von  $\tau_{\text{dec}}$  (a) und der Anstiegszeit (b) dargestellt (■).

(a) In der Zeitkonstante des exponentiellen Abklingens des Stroms zeigt sich, trotz einer erkennbaren Variabilität zwischen den einzelnen P14- und P17-Zellen, im Mittel ein Trend (rote Linie) zu einer schnelleren IPSC-Kinetik mit zunehmendem Alter / Hörfähigkeit. Die gemittelten IPSCs dreier P17-Zellen zeigen dabei extrem niedrige  $\tau_{\text{dec}}$ -Werte (0,54 – 1,26 ms). (b) Auch in der Verteilung der 10 – 90% Anstiegszeiten der IPSCs ist, bei einer ähnlichen Variabilität der Werte zwischen einzelnen P14- und P17-Zellen, im Mittel ein Trend (rote Linie) zu einer Beschleunigung mit zunehmendem Alter erkennbar. Drei P17-Zellen zeigen dabei eine sehr schnelle Anstiegs-kinetik ihrer gemittelten IPSCs (0,19 – 0,26 ms).

Großer ● bei P17 in (b): zwei Neurone mit identischer Anstiegszeit

Fehlerbalken: Standardfehler des Mittelwerts (SEM)

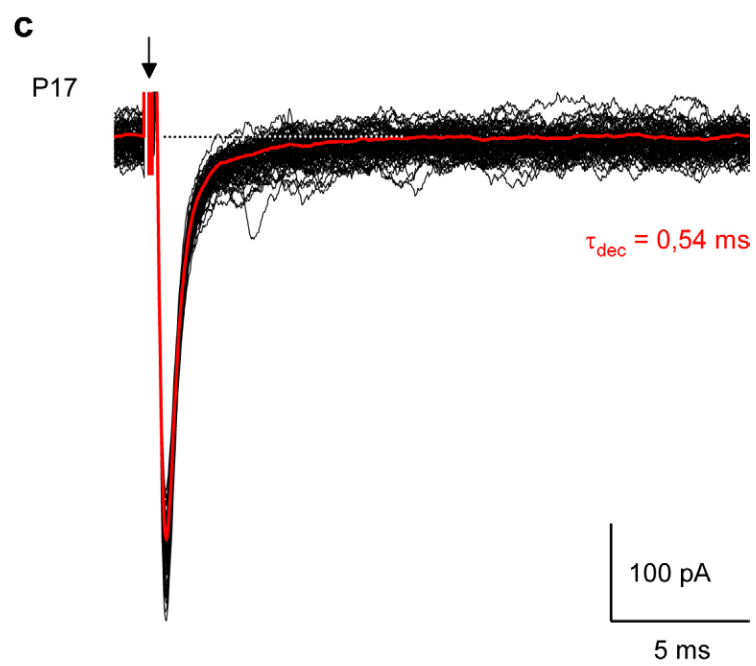
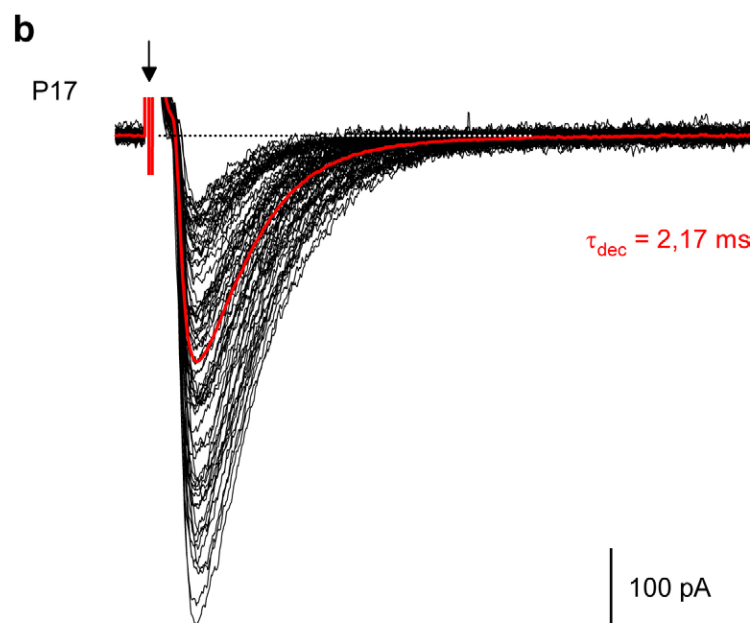
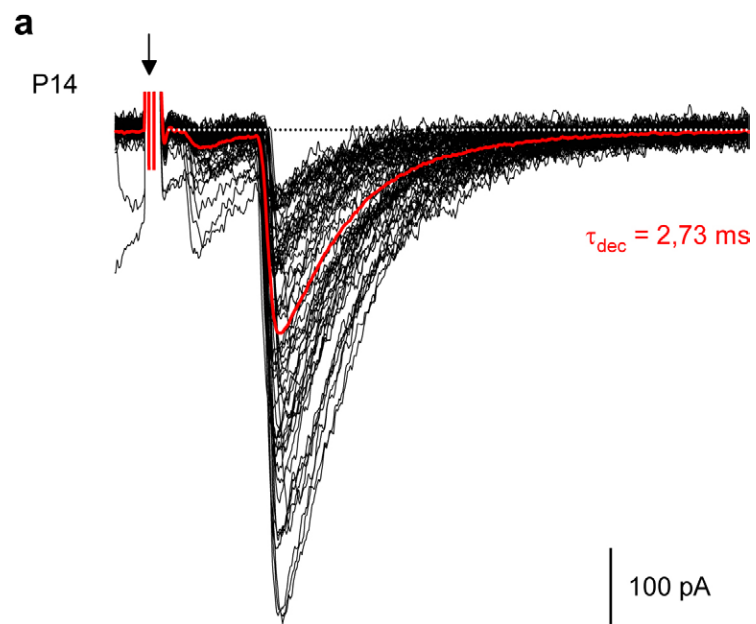


Innerhalb der P14-Gruppe zeigten die gemittelten IPSCs in der Verteilung ihrer Anstiegszeiten eine Zweiteilung. Dabei bildeten 3 / 7 Zellen ein Cluster bei vergleichsweise langsamen Anstiegszeiten (0,87 – 0,95 ms; Abb. 38b), die übrigen vier P14-IPSCs zeigten zwar etwas schnellere Anstiegszeiten (0,27 – 0,59 ms; Abb. 38b), erreichten aber nicht die sehr kurzen Werte der schnellsten P17-IPSCs.

Die IPSCs der beiden am Postnataltag 15 und 16 untersuchten Zellen zeigten eine eher langsame Kinetik. Die Messwerte für  $\tau_{\text{dec}}$  und 10 – 90% Anstiegszeit lagen dabei auf Höhe der Messwerte der langsameren P14- und P17-IPSCs (Abb. 38a,b). In Anbetracht der beachtlichen Variabilität der IPSC-Kinetik bei den untersuchten P14- und P17-Zellen ist es allerdings fraglich, ob diese einzelnen Zellen für die entsprechende Altersstufe als repräsentativ gelten können.

Die graphische Gegenüberstellung inhibitorischer postsynaptischer Ströme von P14- und P17-Zellen (einzelne IPSCs: schwarze Spuren; gemittelte IPSCs: rote Spuren; Abb. 39a-c) zeigt nochmals die festgestellten Unterschiede im Zeitverhalten und verdeutlicht die extrem schnelle Kinetik einiger P17-IPSCs (Abb. 39c). Im Vergleich zu den meisten P14-MSO-Neuronen (Abb. 39a) resultierte die Aktivierung von Leitfähigkeiten für Chloridionen, durch das Öffnen von Glycinrezeptoren, bei den meisten P17-MSO-Neuronen in einer zeitlich kompakteren und damit präziseren Stromantwort (Abb. 39b,c). Besonders deutlich wird diese Beschleunigung der Kinetik am Beispiel der P17-Zelle in Abb. 39c, welche die schnellsten IPSCs der untersuchten Population aufwies. Die IPSCs dieser Zelle zeigten durch eine sehr schnelle Anstiegszeit zum Maximum, gepaart mit einer äußerst kurzen Gesamtzeitdauer und einer ungewöhnlich schnellen Zeitkonstante des Abklingens einen sehr kurzen und damit präzisen Zeitverlauf (Abb. 39c). Zudem war zwischen den einzelnen IPSCs dieser Zelle (schwarze Spuren, Abb. 39c) qualitativ auch nur eine sehr geringe zeitliche Variabilität im Anstieg und Abklingen der Ströme erkennbar. Im Unterschied dazu zeigten Zellen mit einer im Vergleich langsameren IPSC-Kinetik, wie beispielsweise die dargestellte P14- (Abb. 39a) und P17-Zelle (Abb. 39b), qualitativ eine höhere zeitliche Variabilität in der ansteigenden und abklingenden Flanke zwischen den einzelnen IPSCs (schwarze Spuren, Abb. 39a,b).

Eine Analyse der absoluten IPSC-Amplituden wurde hier nicht durchgeführt, da die absolute Amplitude einerseits von der gewählten internen Elektrodenlösung und andererseits von den bereits bei der Analyse der IPSPs (s.h. Kapitel 4.4.3.1) erwähnten externen Faktoren abhängig war. Der Hauptgrund lag hier allerdings in der Verwendung verschiedener Elektrodenlösungen mit unterschiedlichen Chloridionenkonzentrationen (s.h. Kapitel 3.2.4.2; Tab. 14).



Dies wiederum hatte verschiedene Umkehrpotentiale für Chlorid und demzufolge unterschiedliche treibende Kräfte für Chloridionen zur Folge. Da die Größe der IPSCs aber unmittelbar von der treibenden Kraft für Chloridionen abhängt, konnten die absoluten Amplituden der verschiedenen untersuchten Zellen nicht miteinander verglichen werden. Für sich betrachtet, war in jeder analysierten Zelle die Chloridionenkonzentration jedoch konstant, daher war eine Gegenüberstellung der Amplituden einzelner IPSCs einer Zelle relativ zueinander möglich. Der Vergleich dieser relativen Amplituden zeigte in P17-Zellen mit einer sehr schnellen IPSC-Kinetik (3 / 7 Zellen, z.B. Abb. 39c) qualitativ eine geringe Variabilität in der Amplitude zwischen einzelnen IPSCs (schwarze Spuren, Abb. 39c). In allen P14-Zellen (7 / 7 Zellen; z.B. Abb. 39a) und in P17-Zellen mit einer langsameren IPSC-Kinetik (4 / 7 Zellen; z.B. Abb. 39b) war dagegen eine beachtliche Variabilität der Amplituden zwischen den einzelnen IPSCs einer Zelle erkennbar (schwarze Spuren, Abb. 39a,b).

Die Untersuchung der Entwicklung des Zeitverhaltens von synaptisch evozierten Potentialen und Strömen an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus im Zeitraum von zwei bis fünf Tagen nach Hörbeginn zeigte ein eher heterogenes Bild. Während bei einigen, aber nicht allen, der am weitesten entwickelten Zellen (P17) sehr kurze und damit zeitlich äußerst präzise IPSPs und IPSCs festgestellt werden konnten, zeigten nahezu alle IPSPs / IPSCs drei Tage jüngerer Zellen (P14) eine im Vergleich dazu noch eher langsame Kinetik.

---

### Abbildung 39: IPSCs von P14- und P17-MSO-Neuronen

**(a)** Synaptisch evozierte IPSCs einer P14-Zelle (schwarze Spuren), welche mit der Kinetik ihres gemittelten IPSCs (rote Spur) nahe zum Mittelwert von  $\tau_{\text{dec}}$  und 10 – 90% Anstiegszeit der P14-Population aus Abb. 38 liegt. Im Anstieg und Abklingen ist zwischen den einzelnen IPSCs (schwarze Spuren) qualitativ eine merkliche zeitliche Variabilität festzustellen. Qualitativ variieren die Amplituden der IPSCs ebenfalls deutlich. **(b)** Synaptisch evozierte IPSCs einer P17-Zelle (schwarze Spuren), welche mit der Kinetik ihres gemittelten IPSCs (rote Spur) nahe zum Mittelwert von  $\tau_{\text{dec}}$  und 10 – 90% Anstiegszeit der P17-Population aus Abb. 38 liegt. Im Vergleich zu P14-IPSCs weisen diese P17-IPSCs einen zeitlich etwas kompakteren Verlauf auf. Qualitativ ist bei dieser P17-Zelle ebenso eine zeitliche Variabilität im Anstieg und Abklingen zwischen den einzelnen IPSCs (schwarze Spuren) zu erkennen. Auch die Amplituden der IPSCs zeigen qualitativ eine merkliche Variabilität. **(c)** Synaptisch evozierte IPSCs (schwarze Spuren) der P17-Zelle, deren gemittelter IPSC (rote Spur) die schnellste Kinetik der untersuchten Population an MSO-Neuronen zeigt (Abb. 38). In ihrem Verlauf weisen diese P17-IPSCs eine vergleichsweise sehr schnelle Kinetik auf. Diese P17-Zelle zeigt qualitativ nur eine geringe zeitliche Variabilität im Anstieg und Abklingen zwischen den einzelnen IPSCs (schwarze Spuren). Die Amplitudenvariabilität der IPSCs ist qualitativ ebenfalls gering.

Der angegebene  $\tau_{\text{dec}}$ -Wert wurde am gemittelten IPSC der jeweiligen Zelle (rote Spuren) bestimmt. Pfeil: Stimulusartefakt (abgeschnitten); Gestrichelte Linie: Haltestrom

---

Die bei der Untersuchung der IPSCs festgestellte relativ hohe Variabilität in der Kinetik könnte darauf hinweisen, dass die Entwicklungsprozesse, die zu verkürzten Zeitkonstanten der Inhibition führen, am Postnataltag 17 zwar schon erkennbar sind, aber noch nicht in allen Zellen abgeschlossen waren.

## 5 Diskussion

Wie die Ergebnisse des anatomischen Teiles der Arbeit zeigen, beschränken sich die inhibitorischen, glycinergen Eingänge bei MSO-Neuronen adulter Wüstenrennmäuse räumlich auf die Somata und extrem proximalen Abschnitte der Dendriten. Bei MSO-Neuronen von Wüstenrennmäusen ohne Hörerfahrung (jung) und monaural aufwachsenden Tieren (UCA) zeigt sich keine solche räumliche Differenzierung der inhibitorischen Eingänge. Die homogene Verteilung von glycinergen Eingängen an MSO-Neuronen dieser Tiere unterscheidet sich dabei signifikant von der bei adulten Tieren beobachteten Verteilung.

Neurone der LSO und des SPN, beides Nuclei die nicht an der initialen Verarbeitung von Reinton-ITDs beteiligt sind, zeigen in der adulten Wüstenrennmaus keine räumliche Beschränkung der glycinergen Eingänge auf die Somata und proximalen Dendriten.

Die inhibitorischen, glycinergen Projektionen zu MSO-Neuronen der Ratte zeigen ebenso keine spezifische räumliche Differenzierung. Sowohl bei jungen, als auch bei adulten Ratten verteilen sich die inhibitorischen Eingänge homogen über Somata und gesamte Dendriten. Eine räumliche Beschränkung der glycinergen Eingänge auf die Somaregion wie bei adulten Wüstenrennmäusen hat sich bei adulten Ratten nicht entwickelt.

Die Ergebnisse des *in vitro* elektrophysiologischen Teiles der Arbeit zeigen auf Ebene der biophysikalischen Membraneigenschaften bei MSO-Neuronen von Wüstenrennmäusen eine altersabhängige Verringerung im Eingangswiderstand und der passiven Membranzeitkonstante. Zudem war innerhalb der ersten zwei Tage nach Hörbeginn (P12 – P14) eine deutliche Reifung der spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten für Natrium- und Kaliumionen erkennbar. Die Untersuchung evozierter inhibitorischer postsynaptischer Potentiale und Ströme an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus ergab erste Hinweise auf eine Kinetik im Bereich von nicht mehr als hunderten von  $\mu$ s. Tendenziell zeigte sich bei MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus zwischen Postnataltag 14 und 17 eine Entwicklung in Richtung schnellerer kinetischer Eigenschaften von IPSPs und IPSCs mit zunehmendem Alter der Tiere.

### **5.1 Anmerkungen zu den Methoden**

#### **5.1.1 Immunhistochemie**

Ein Problem, das sich bei jeder Analyse immunhistochemischer Färbungen stellt, ist die Frage nach der Spezifität der Reaktion. In erster Linie hängt die Spezifität der Reaktion

von den primären Antikörpern ab, die im Idealfall eine bestimmte Proteinsequenz (Epitop) am Antigen erkennen sollten. Da die Bindung des Antikörpers am Antigen nach einem dynamischen Gleichgewichtsprozess abläuft ist allerdings nicht auszuschließen, dass es zu Wechselwirkungen mit anderen, ähnlichen Epitopen kommt. Diese unspezifischen Bindungen können einerseits eine unerwünschte Hintergrundfärbung und andererseits schlichtweg falsch-positive Ergebnisse erzeugen. Eine hohe Sicherheit bei der Spezifität der verwendeten Antikörper ist daher unbedingt notwendig. Bei den in der Arbeit verwendeten Antikörpern kann aus mehreren Gründen von einer hohen Spezifität für das jeweilige Antigen ausgegangen werden. So wurden alle verwendeten Antikörper von Herstellerseite durch biochemische Verfahren (Western blot; Immunblot; Immunelektrophorese; Elisa) auf ihre Spezifität geprüft (s.h. die entsprechenden Datenblätter der Hersteller). Daneben wurden einige der verwendeten Antikörper in einer Vielzahl von Hirngebieten und Tiermodellen erfolgreich eingesetzt. So wurde der verwendete Antikörper gegen Glycin im auditorischen System bereits zur Charakterisierung glycinerner Zellen im CN der Wüstenrennmaus (Gleich & Vater 1998) und im SOC der Schnurrbartfledermaus verwendet (Vater 1995). Zudem zeigte ein Vergleich mit den Ergebnissen weiterer Untersuchungen, die Glycin – Immunhistochemie im auditorischen System der Katze (Saint Marie et al. 1989) und des Meerschweinchens (Helfert et al. 1989) sowie im gesamten Gehirn der Ratte (Rampon et al. 1996) durchführten, keine Unterschiede im generellen Färbungsmuster charakteristischer, positiv markierter oder nicht-markierter Strukturen. So waren auch in der vorliegenden Arbeit beispielsweise die Zellen der Trapezkörpernuclei (MNTB, LNTB, VNTB) deutlich positiv markiert, während im Neocortex keine Färbung festgestellt werden konnte.

Der Antikörper gegen Gephyrin wurde durch extensive Studien an Neuronen des Rückenmarks (Alvarez et al. 1997; Kirsch & Betz 1998; Pfeiffer et al. 1982; Todd et al. 1995), der Retina (Grunert & Wässle 1993; Sassoe-Pognetto et al. 1994) und im auditorischen System an Neuronen der LSO in der Wüstenrennmaus (Koch & Sanes 1998; Korada & Schwartz 1999) und VCN-Neuronen im Meerschweinchen (Altschuler et al. 1986; Wenthold et al. 1988) eingehend charakterisiert. Die elektronenmikroskopisch sichtbare Markierung für Gephyrincluster in der MSO der Wüstenrennmaus und der Ratte war dabei nicht unterscheidbar zu publizierten Daten im auditorischen Stammhirn (LSO: Korada & Schwartz 1999; VCN: Wenthold et al. 1988) und im Rückenmark (Triller et al. 1985). Auch der Antikörper gegen den dendritischen Marker MAP2 (Izant & McIntosh 1980) wurde beispielsweise im Cerebellum (Burgoyne & Cumming 1984), Hippocampus (Caceres et al. 1986) und der Retina (Tucker & Matus 1988) erfolgreich eingesetzt.

Der in der Arbeit verwendete polyclonale Antikörper gegen die  $\alpha 1$ -Untereinheit des Glycinrezeptors wurde bisher noch nicht extensiv immunhistochemisch getestet und fand erstmals im auditorischen System Verwendung. Bisherige Studien zur Verteilung von Glycinrezeptoren im auditorischen Hirnstamm verwendeten dazu einen monoclonalen Antikörper (Altschuler et al. 1986; Friauf et al. 1997; Wenthold et al. 1988). Dieser konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht verwendet werden, da sonst die Doppelmarkierung der Dendriten mit dem ebenfalls monoclonalen MAP2-Antikörper nicht möglich gewesen wäre. Denn beide monoclonalen Antikörper sind in der Maus hergestellt und tragen dieselbe Immunglobulin-Bindungsstelle (IgG1) für den sekundären Antikörper, was eine selektive Unterscheidung durch verschiedenfarbige sekundäre Antikörper unmöglich macht. Der Vergleich von Kontrollschnitten (polyclonaler Antikörper) zeigte jedoch beispielsweise in der LSO und dem VCN der Wüstenrennmaus und der Ratte keine auffälligen qualitativen Unterschiede zu den publizierten anti-Glycinrezeptorfärbungen (monoclonaler Antikörper; LSO Ratte: Friauf et al. 1997; VCN Meerschweinchen: Altschuler et al. 1986; Wenthold et al. 1988). Weitere mit dem polyclonalen Antikörper markierte Kontrollschnitte verschiedener Gehirnareale zeigten in ihrem Färbungsmuster zudem keine qualitativen Unterschiede zur Verteilung von mRNA der  $\alpha 1$ -Untereinheit des Glycinrezeptors in diesen Strukturen (Malosio et al. 1991a; Sato et al. 1991). In Übereinstimmung mit diesen Arbeiten (Malosio et al. 1991a; Sato et al. 1991), war beispielsweise im Cerebellum aber nicht im Thalamus und Neocortex positive Markierung für Glycinrezeptoren erkennbar. Daneben konnten Arbeiten an Renshawzellen des Rückenmarks sowohl in der qualitativen, wie auch in der quantitativen Verteilung von  $\alpha 1$ -Untereinheiten des Glycinrezeptors keine Unterschiede zwischen dem monoclonalen (Alvarez et al. 1997; Geiman et al. 2000) und dem polyclonalen Antikörper (Geiman et al. 2002) feststellen.

Neben dem Vergleich mit nachweislich positiven und negativen Kontrollregionen im Gehirn zeigten auch die Standardtests zur Spezifität einer immunhistochemischen Färbung, wie Weglassen des primären, sekundären oder tertiären Antikörpers, keine unspezifischen Reaktionen. Zudem zeigten mit verschiedenen Techniken (Einfachfärbung, Doppelfärbung, Fluoreszenzmarkierung, DAB-Markierung, Gefrierschnitte; Vibratomschnitte; s.h. Kapitel 3 Material und Methoden) gefärbte Hirnschnitte für jeden Antikörper konsistent gleiche Ergebnisse. Unspezifische Wechselwirkungen und Kreuzreaktionen der einzelnen Antikörper und Reagenzien können somit nahezu ausgeschlossen werden. Es kann daher von einem hohen Maß an Zuverlässigkeit bei den durchgeführten immunhistochemischen Reaktionen ausgegangen werden.

Wie in den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen erkennbar, war die Membran- und Gewebeerhaltung bei jungen Wüstenrennmäusen und Ratten nicht optimal. Hirnschnitte dieser jungen Tiere schienen zum einen generell brüchiger zu sein, zum anderen wirkten die Zellmembranen im Vergleich zu Neuronen adulter Tiere in den lichtmikroskopischen Präparaten nicht so klar abgegrenzt und leicht aufgequollen. In den EM-Präparaten junger Tiere waren die Membranen z.T. diskontinuierlich, das Gewebe wirkte daher im Unterschied zu adulten Tieren weniger gefestigt. Möglicherweise ist dieses Verhalten durch die geringere Myelinisierung des Gewebes (Gleich & Vater 1998) oder durch eine weniger stark ausgeprägte extrazelluläre Matrix, die stabilisierend wirken könnte, zu erklären. Auch die Abwesenheit von Astrocytenlamellen in jungem Gewebe könnte auf eine geringere Stabilität hinweisen. Besonders bei Gefrierschnitten dürften sich diese Charakteristika negativ auf die Gewebeerhaltung auswirken, da durch das Gefrieren winzige Eiskristalle entstehen können, die zu einem leichten Aufbrechen der Membranen führen. Dies hilft eine gleichmäßige Penetration des Antikörpers in das Gewebe zu gewährleisten, belastet jedoch etwas die Gewebeerhaltung, was sich wiederum in den leicht aufgequollenen Zellmembranen bei jungen Tieren äußern kann. Für die Immunhistochemie könnte das bedeuten, dass die Reagenzien leichter und besser in das Gewebe eindringen und damit eine kräftigere Färbung erzeugen können. Für Färbungen mit einem bestimmten Antikörper wurden die Konzentrationen der einzelnen Reagenzien in Vorexperimenten so abgestimmt, dass optimale Ergebnisse in adultem Gewebe erzielt werden konnten. Da aber diese Konzentrationen in allen Experimenten für junges und adultes Gewebe gleich waren, erscheinen die Schnitte junger Tiere oftmals kräftiger gefärbt als die Schnitte adulter Tiere. Auf die Interpretation der immunhistochemischen Färbungen hatten diese qualitativ-optischen Unterschiede allerdings keine Auswirkungen, da bei jeder Analyse, speziell bei der Quantifizierung, immer die Verteilung isolierter gefärbter Boutons oder Cluster und nicht eine auf der Intensität basierende Färbungsdichte bestimmt wurde.

#### 5.1.1.1 Der Glycinrezeptorkomplex und mögliche Interaktionen mit GABA

Der Glycinrezeptor, ein ligandengesteuerter Ionenkanal, besteht aus einem pentameren Proteinkomplex der einen selektiv für Chloridionen (Hamill et al. 1983; Sontheimer et al. 1989) leitfähigen Transmembrankanal bildet. Der pentamere Proteinkomplex setzt sich dabei aus drei sog.  $\alpha$ -Untereinheiten (48 kDa Protein) und zwei  $\beta$ -Untereinheiten (58 kDa Protein) zusammen (s.h. die Übersichtsartikel Betz et al. 1994; Kuhse et al. 1991a). Die  $\alpha$ -Untereinheiten unterteilen sich dabei in vier Untertypen ( $\alpha 1 - 4$ ), die abhängig vom



postnatalen Entwicklungsstand regional unterschiedlich im Gehirn exprimiert werden (Harvey et al. 2000; Malosio et al. 1991a; Matzenbach et al. 1994; s.h. auch die Übersichtsartikel Kuhse et al. 1991a; Legendre 2001). Embryonal und kurz nach der Geburt finden sich ausschließlich homomere, aus fünf  $\alpha 2$ -Untereinheiten zusammengesetzte Glycinrezeptoren (Becker et al. 1988). Während der postnatalen Entwicklung nimmt der Anteil von  $\alpha 2$ -Glycinrezeptoren stetig ab und ist spätestens nach der zweiten postnatalen Woche vollständig durch Glycinrezeptoren aus  $\alpha 1/3$ - und  $\beta$ -Untereinheiten ersetzt (Akagi et al. 1991; Becker et al. 1992; Kuhse et al. 1991b; Malosio et al. 1991a). Während die  $\alpha 2$ -Untereinheit im gesamten Gehirn nachgewiesen werden konnte (Kuhse et al. 1991b; Triller et al. 1990), finden sich mRNA und Protein der  $\alpha 1$ -Untereinheit nur im Rückenmark, Stammhirn, den tiefen Nuclei des Cerebellums, dem inferioren und superioren Colliculus sowie dem Hypothalamus (Malosio et al. 1991a,b). Da sich die  $\alpha 3$ -Untereinheit nur im infralimbischen System, Hippocampus, der granulären Schicht des Cerebellums und in sehr geringem Ausmaß im Rückenmark findet (Malosio et al. 1991a), kann davon ausgegangen werden, dass alle Glycinrezeptoren im adulten Stammhirn dem  $\alpha 1/\beta$ -Typus entsprechen. Die  $\alpha 4$ -Untereinheit konnte bisher nur embryonal im Rückenmark der Maus (Matzenbach et al. 1994) und des Huhns festgestellt werden (Harvey et al. 2000). Wie Untersuchungen auf mRNA-Ebene im auditorischen Stammhirn der Ratte zeigen konnten, ist die Expression von  $\alpha 2$ -Untereinheiten selbst embryonal und früh postnatal sehr gering (Piechotta et al. 2001), wogegen ab Postnataltag 8 sowohl mRNA als auch Protein der  $\alpha 1$ -Untereinheit nachweisbar sind (Friauf et al. 1997; Piechotta et al. 2001). Aus diesen Ergebnissen und der generellen regionalen Verteilung der Untereinheiten kann daher gefolgert werden, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Altersstufen und Nuclei des auditorischen Stammhirns nur Glycinrezeptoren des  $\alpha 1/\beta$ -Typs exprimieren. Da der verwendete polyclonale Antikörper spezifisch an die  $\alpha 1$ -Untereinheit im Glycinrezeptor bindet, ist von einer vollständigen Markierung aller Glycinrezeptoren in den untersuchten Altersstufen auszugehen.

Bei biochemischen Aufreinigungen des Glycinrezeptors zeigte sich neben den  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten immer noch ein drittes, cytoplasmatisches 93 kDa Protein, das Gephyrin (Graham et al. 1985; Pfeiffer et al. 1982; Pior et al. 1992). Dieses sog. periphere Membranprotein (Schmitt et al. 1987) bindet an die  $\beta$ -Untereinheit des Glycinrezeptors und verankert damit die Glycinrezeptoren über eine hochaffine Bindung zu Tubulin mit dem Cytoskelett (Kirsch et al. 1991; Kneussel et al. 1999b; Meyer et al. 1995). Wie aus Studien an Zellen des Rückenmarks in denen die Expression von Gephyrin durch

Antisense-RNA verhindert wurde (Kirsch et al. 1993) und an Gephyrin KO-Mäusen („knock-out“ Mäuse; Feng et al. 1998) hervorgeht, ist Gephyrin für die postsynaptische Aggregation von Glycinrezeptoren essentiell. Diese Clusterbildung von Glycinrezeptoren in postsynaptischen Membranspezialisierungen, welche genau den aktiven Zonen des präsynaptischen Terminals gegenüberliegen (Triller et al. 1990), ist notwendig um funktionsfähige glycinerge Synapsen zu schaffen. Fehlt das Gephyrin, so verteilen sich die Glycinrezeptoren diffus in der postsynaptischen Membran von Neuronen des Rückenmarks (Feng et al. 1998; Kirsch et al. 1993) und des Stammhirns (Feng et al. 1998), eine Clusterbildung und damit funktionsfähige glycinerge Synapsenkomplexe können sich nicht ausbilden. Funktionsfähige glycinerge Synapsen können daher nur durch eine postsynaptische Aggregation von Glycinrezeptoren etabliert werden und sind damit unmittelbar von Gephyrin abhängig. Die postsynaptische Gephyrinmatrix ist damit ein integraler Bestandteil glycinерger Synapsen.

Die Verwendung von immunhistochemisch markierten Gephyrinclustern als eindeutigen postsynaptischen Marker für glycinerge Synapsen kann allerdings problematisch sein, da eine Reihe anderer Untersuchungen Gephyrin eine analoge Rolle bei der postsynaptischen Aggregation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zuschreiben (s.h. die Übersichtsartikel Kneussel 2002; Kneussel & Betz 2000; Legendre 2001). Speziell konnte gezeigt werden, dass Gephyrin im Rückenmark (Bohlhalter et al. 1994; Cabot et al. 1995; Todd et al. 1996; Triller et al. 1987), in der Retina (Sassoé-Pognetto et al. 1995), im Bulbus Olfactorius (Giustetto et al. 1998), im Hippocampus (Craig et al. 1996) und im Neocortex (Essrich et al. 1998) an der Bildung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptorclustern beteiligt ist. Zudem fehlt in der Gephyrin KO-Maus eine spezifische postsynaptische Aggregation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren des  $\gamma 2/\alpha 2$ -Typs (Kneussel et al. 1999a). Diese Befunde könnten ein potentiell Problem bei der Interpretation der Ergebnisse der Gephyrinfärbung in der vorliegenden Arbeit darstellen, da sowohl im SOC der Wüstenrennmaus (Korada & Schwartz 1999; Roberts & Ribak 1987), als auch der Ratte (Campos et al. 2001; Sato et al. 2000) der Neurotransmitter GABA (Korada & Schwartz 1999), das GABA synthetisierende Enzym GAD („glutamic acid decarboxylase“; Roberts & Ribak 1987) und Untereinheiten von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Campos et al. 2001; Korada & Schwartz 1999; Sato et al. 2000) nachgewiesen wurden. Allerdings kommen die erwähnten Studien zu teilweise widersprüchlichen Ergebnissen. So zeigen laut Roberts & Ribak (1987) GAD-positive Punkte an adulten MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus eine Konzentration am Soma der Zellen, was sich mit der hier beschriebenen Lage der glycinergen Synapsen beim adulten Tier zu decken scheint (s.h. Kapitel 4.1). An LSO- und

SPN-Neuronen zeigen sich nach dieser Studie generell nur sehr wenige GAD-Punkta (Roberts & Ribak 1987). Die Verteilung GABAerger Boutons zeigt dagegen in der MSO der Wüstenrennmaus eine altersabhängige Zunahme von Postnataltag 14 (fast keine Färbung; Korada & Schwartz 1999) bis Postnataltag 21 (mittlere Färbungsintensität; Korada & Schwartz 1999) wobei sich die GABAergen Boutons bei P21 hauptsächlich an den distalen Dendriten finden. In der LSO finden Korada & Schwartz (1999) bis P21 eine deutliche Färbung von GABAergen Boutons, die sich wiederum von P21 zu adulten Tieren massiv reduziert. Obwohl sich in dieser Studie keine Aussagen zur Verteilung GABAerger Boutons an MSO-Neuronen adulter Wüstenrennmäuse finden, könnte man eingedenk der GAD-Verteilung (Roberts & Ribak 1987) über einen ähnlichen Rückgang der GABAergen Boutons von den distalen Dendriten der MSO-Neurone spekulieren. Ein solcher Rückgang der GABAergen Boutons müsste höchstwahrscheinlich parallel zur Verschiebung der glycinergen Synapsen von den Dendriten auf die Somaregion stattfinden, da Axone von MNTB- und LNTB-Neuronen die einzige Quelle für inhibitorische Eingänge zur MSO darstellen. Daraus eröffnet sich die Möglichkeit, über eine gleichzeitige Ausschüttung beider inhibitorischer Neurotransmitter an einem präsynaptischen Terminal bei MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus zu spekulieren. In der Tat lassen sich im MNTB und LNTB einige wenige Zellen nachweisen, die sowohl für Glycin als auch für GABA Immunreaktivität zeigen (Korada & Schwartz 1999; O. Gleich pers. Gespräch). Eine solche gleichzeitige Ausschüttung beider inhibitorischer Neurotransmitter wurde bereits für Synapsen zu Zellen des VCN (Moore et al. 1996) und VNLL (Riquelme et al. 2001) sowie des Rückenmarks (Ornung et al. 1998; Schneider & Fyffe 1992; Triller et al. 1987) beschrieben. Es ist allerdings fraglich ob GABA an diesen Synapsen hauptsächlich via ionotroper GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf die Zellen wirkt, da Antikörperfärbungen in der MSO und LSO der Wüstenrennmaus (Korada & Schwartz 1999) nur sehr wenige positiv markierte GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten nachweisen können. Auf Ebene der mRNA zeigt sich in der MSO der Ratte wenig (Campos et al. 2001) bis gar keine Markierung (Sato et al. 2000) für GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten. Zudem konnten physiologisch *in vitro* in der MSO der Wüstenrennmaus (P17 – P25) nur an sehr wenigen Zellen (ca. 5%) Effekte von GABA oder Bicucullin (GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist) nachgewiesen werden (Grothe & Sanes 1993). Dagegen wurden in ca. 88% der untersuchten Zellen EPSPs vollständig durch Glycin blockiert (Grothe & Sanes 1993), dazu ließen sich durch Strychnin in 90% der untersuchten Zellen Aktionspotentiale auslösen, welche vorher durch synaptische glycinerge Inhibition blockiert waren (Grothe & Sanes 1993). In der MSO der Ratte konnte *in vitro* nur bis maximal Postnataltag 6 ein signifikanter Anteil der IPSCs mit

Bicucullin blockiert werden, in Zellen älterer Tiere dagegen (bis P14) zeigte die Applikation von Bicucullin keine Effekte, die IPSCs konnten nur durch Strychnin blockiert werden, waren also rein glycinerg (Smith et al. 2000). Schließlich konnte in der LSO der Wüstenrennmaus durch eine *in vitro* Arbeit zur Entwicklung der IPSCs gezeigt werden, dass sich von Postnataltag 4 bis 14 eine hauptsächlich GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Inhibition vollständig in eine Glycinrezeptor vermittelte Inhibition umwandelt (Kotak et al. 1998). Für die anatomisch nachgewiesenen GABAergen Boutons bleibt daher als einzige Erklärungsmöglichkeit eine Aktivität von GABA über den metabotropen GABA<sub>B</sub>-Rezeptor. Weil für Glycin selbst keine metabotropen Rezeptoren existieren, könnte eine Nutzung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sinnvoll erscheinen um über G-Protein gekoppelte Systeme modulatorisch beispielsweise das Calciumniveau im Terminal oder der postsynaptischen Zelle zu steuern. Im Rückenmark (Grudt & Henderson 1998; O'Brien & Berger 1999) und an GBCs / SBCs des AVCN (Lim et al. 2000) konnte ein solcher Mechanismus bereits an Synapsen, die sowohl Glycin als auch GABA ausschütten, nachgewiesen werden. Auch für die MSO der Ratte wurde eine präsynaptische Wirkung von GABA über GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren vorgeschlagen (Owens & Forsythe 2000; Smith et al. 2000), allerdings bleibt unklar, welche funktionale Rolle präsynaptische GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren dort spielen könnten. In der LSO der Wüstenrennmaus dagegen konnte eine tragende Rolle postsynaptischer GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren bei der Entwicklung einer räumlichen Verfeinerung der inhibitorischen Eingänge nachgewiesen werden (Kotak et al. 2001; s.h. auch Kapitel 5.3.2). Daneben konnten GABA<sub>B</sub>-Rezeptoruntereinheiten anatomisch an MSO-Neuronen der Katze (Winer & Larue 1999) und im SOC der Ratte (Margeta-Mitrovic et al. 1999) nachgewiesen werden. Interessanterweise zeigten die Cluster von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren dabei in der MSO der Katze eine räumliche Beschränkung auf die unmittelbare Somaregion (Winer & Larue 1999). Dies könnte, wenn Glycin und GABA von der gleichen Synapse ausgeschüttet werden, auf eine mögliche Colokalisierung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren mit glycinergen Synapsen hinweisen.

Für die Interpretation der Ergebnisse der Gephyrin – Immunhistochemie in der vorliegenden Arbeit scheinen die eben diskutierten Befunde allerdings von geringer Relevanz zu sein. Einerseits zeigen sowohl die anti-Gephyrinfärbung als auch die anti-Glycin und anti-Glycinrezeptorfärbung identische Ergebnisse, andererseits geben die anatomischen und vorallem die physiologischen Arbeiten deutliche Hinweise auf eine praktisch ausschließlich glycinerge und nur äußerst geringe GABA<sub>A</sub>-Rezeptor vermittelte Inhibition an MSO- und LSO-Neuronen der Wüstenrennmaus und der Ratte in den untersuchten Altersstufen. Aus den angeführten Gründen ergeben sich für die

elektrophysiologischen *in vitro* Untersuchungen an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus ebenfalls primär keine Evidenzen, welche die Ergebnisse zur Kinetik der IPSPs und IPSCs in Frage stellen könnten. Zudem wurde während der Ableitungen eine theoretisch mögliche GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Aktivität durch Applikation eines spezifischen Antagonists (Gabazine / SR95531) ausgeschlossen. Zur möglichen Funktion von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren bei der Entwicklung der räumlichen Differenzierung glycinерger Eingänge in der MSO der Wüstenrennmaus s.h. Kapitel 5.3.2.

### 5.1.2 Elektrophysiologie

Zur Untersuchung der Entwicklung von intrinsischen Membraneigenschaften und der Kinetik von IPSPs / IPSCs wurde aus mehreren Gründen die PCL-Technik der Ableitung mit scharfen Elektroden vorgezogen. Wie bereits ausführlich in den Methoden (s.h. Kapitel 3.2.4.2 und 3.2.5) dargestellt, ist für die genaue Messung der Kinetik von synaptischen Strömen eine möglichst gute Kontrolle über spannungsgesteuerte Leitfähigkeiten notwendig. Bei der Ableitung mit scharfen Elektroden, die im CC-Modus stattfindet, ist eine solche Kontrolle nicht gegeben. Dies hat zwar den Vorteil, dass das Verhalten der Zellen in einem mehr der *in vivo* Situation entsprechenden Kontext untersucht werden kann, allerdings ist es nicht möglich das Verhalten der Inhibition isoliert von spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten zu untersuchen. Desweiteren wird trotz des sehr geringen Spitzendurchmessers durch scharfe Elektroden meist ein Loch in die Zellwand gerissen, welches sich nicht wieder schließt und damit unkontrollierbare Leckströme erzeugt (Gulledge & Stuart 2003). Diese Leckströme machen eine exakte Messung zeitlicher Parameter unmöglich. Auch die Untersuchung von intrinsischen Eigenschaften kann mit scharfen Elektroden schwierig sein, da sich durch den hohen Spitzenwiderstand ( $> 100 \text{ M}\Omega$ ) oftmals entweder nur unzureichend Strom in die Zellen injizieren lässt oder durch die spontane Entladung von kapazitiven Elementen Schwingungen an der Elektrodenspitze entstehen können. Dazu ist es aufgrund der bereits erwähnten Leckströme sehr schwierig genaue Aussagen über spannungsabhängige Leitfähigkeiten zu treffen. Durch Verwendung der PCL-Technik konnte generell eine weitaus bessere Kontrolle der experimentellen Bedingungen erreicht werden. Durch den hohen Abdichtwiderstand ( $\text{G}\Omega$ -Bereich) entstanden nur sehr geringe Leckströme, die zudem messbar und kompensierbar waren. Die direkte Verbindung der Elektrode mit dem Cytoplasma und der geringe Widerstand der Elektrode ermöglichte auch ein problemloses injizieren von Strompulsen zur Analyse der intrinsischen Eigenschaften. Weit wichtiger war aber die Kontrolle der spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten durch den VC-Modus und den Einsatz von

Cäsiumsalzen zur Blockade von Kaliumkanälen bei der Analyse der Kinetik von inhibitorischen postsynaptischen Strömen. Nur so konnte die Kinetik der IPSCs isoliert untersucht werden. Ein Nachteil der PCL-Technik bei Experimenten im auditorischen Stammhirn ist allerdings, dass nur Zellen in vergleichsweise jungem Gewebe (bis P17) untersucht werden konnten. Ableitungen mit scharfen Elektroden konnten im Gegensatz dazu an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus bis P25 (Grothe & Sanes 1993, 1994) und an MSO-Neuronen des Meerschweinchens bis P35 (Smith 1995) durchgeführt werden. Speziell im Hinblick auf die funktionelle Rolle glycinерger Inhibition im adulten Tier wäre eine Analyse der IPSC-Kinetik in älteren Wüstenrennmäusen, mit adultem Hörsystem (ca. P21; Sanes & Rubel 1988), sicher wünschenswert gewesen. Es scheint aber generell bei PCL-Ableitungen im auditorischen Stammhirn sehr schwierig zu sein, Gewebe älterer Tieren zu untersuchen. So lagen die ältesten, erfolgreich abgeleiteten Zellen in der MSO der Ratte bei P14 (Smith et al. 2000), in der LSO der Wüstenrennmaus bei P19 (Kotak & Sanes 2000) und im MNTB der Ratte bei P14 (Taschenberger & von Gersdorff 2000). Lediglich im MNTB (Futai et al. 2001) und an Octopuszellen des PVCN (Bal & Oertel 2000, 2001; Golding et al. 1999) der Maus konnten bisher PCL-Experimente bis zu einem Alter von P27 durchgeführt werden. Die Schwierigkeiten, Experimente bei diesen Altersstufen durchzuführen, könnten möglicherweise auf die bei älteren Tieren starke Myelinisierung der eingehenden Axone und auf ein massives Wachstum von Gliazellen auf den MSO-Neuronen während der Präparation der Hirnschnitte zurückzuführen sein. Beide Faktoren könnten dazu beitragen, dass die Ausbildung des Gigaohm-Abdichtwiderstandes durch eine Verschmutzung der Elektrodenspitze nicht möglich ist. Selbst wenn ein ausreichender Abdichtwiderstand etabliert werden könnte, würde die starke Verschmutzung der Elektrodenspitze den Serienwiderstand so stark erhöhen, dass sinnvolle Ableitungen nicht mehr durchführbar wären.

## **5.2 Räumliche Beschränkung der glycinерgen Eingänge**

### **5.2.1 Verteilung glycinерger Eingänge in der MSO, der LSO und dem SPN adulter Wüstenrennmäuse**

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, zeigen nur die glycinерgen Eingänge zu MSO-Neuronen bei der adulten Wüstenrennmaus eine spezifische räumliche Beschränkung auf die Zellkörper und extrem proximalen Dendriten. An Neuronen der LSO und des SPN in der adulten Wüstenrennmaus konnte eine solche spezifische Verteilung nicht nachgewiesen werden. Betrachtet man nun die Physiologie der drei Nuclei spezifisch unter

dem Gesichtspunkt von Schalllokalisation im Azimut, so lassen sie sich im Prinzip in zwei Gruppen einteilen. Die MSO der Wüstenrennmaus stellt für tieffrequente Reintöne klar die initiale Stufe der Verarbeitung von ITDs dar (Brand et al. 2002; Spitzer & Semple 1995). Bei der Verarbeitung der ITDs kommt dabei einer contralateral führenden, phasengekoppelten Inhibition, die zeitlich präzise mit der Erregung von beiden Ohren interagiert, eine entscheidende Rolle zu (Brand et al. 2002). Allein die zeitlich genaue Abstimmung der Hemmung kann dabei das Antwortverhalten der MSO-Neurone in der ITD-Verarbeitung so anpassen, dass die maximale Steigung und damit der Bereich größter Dynamik der zyklischen ITD-Funktion, im verhaltensrelevanten Bereich plaziert wird. Wie Brand et al. (2002) weiter zeigen, verringerte sich dieser nutzbare dynamische Bereich im Durchschnitt um 67% wenn die Inhibition iontophoretisch blockiert war. Eine zeitlich präzise Inhibition scheint daher ursächlich der Abstimmung der ITD-Sensitivität der MSO-Neurone in der Wüstenrennmaus zugrundezuliegen.

Die Funktion der LSO wird ebenfalls primär im Kontext von Schalllokalisation im Azimut gesehen, allerdings klassischerweise nicht in der initialen Verarbeitung von ITDs, sondern in der Analyse der bei höheren Frequenzen entstehenden IIDs (s.h. die Übersichtsartikel Irvine 1986, 1992; Yin 2002). Obwohl als der entscheidende Parameter bei der IID-Verarbeitung die Stärke der Erregung und Hemmung von den beiden Ohren angesehen wird, mehrten sich Hinweise, dass die genaue zeitliche Abstimmung des ipsilateral erregenden AVCN-Eingangs und des contralateral hemmenden MNTB-Eingangs ebenso zur präzisen Auflösung von IIDs beiträgt (Irvine et al. 2001; Park et al. 1996, 1997). Der entscheidende Punkt ist dabei, dass der Intensitätsunterschied im Schallsignal zwischen beiden Ohren intern in einen Laufzeitunterschied der Erregung und Hemmung zur LSO-Zelle umgerechnet wird (Irvine et al. 2001; Jeffress 1948; Park et al. 1996, 1997; Pollak 1988). Das relative Zeitverhalten von Erregung und Hemmung ist wiederum abhängig von der Intensität des Stimulus am jeweiligen Ohr. Bei einer Erhöhung der Intensität an einem Ohr wird nicht nur die Stärke des entsprechenden Eingangs erhöht, sondern es verkürzt sich auch die Laufzeit dieses Signals, d.h. die Erregung oder Hemmung wird früher, also mit geringerer Latenz, an der LSO-Zelle ankommen. Dagegen wird sich die Latenz des weniger stark stimulierten Eingangs entsprechend verlängern (Irvine et al. 1995; Pollak 1988). Nach der sog. schwachen Form (Irvine et al. 2001) der Latenzhypothese (Jeffress 1948) würde die IID-Sensitivität der LSO-Neurone zumindest teilweise auf den Zeitunterschieden beruhen, welche durch die Effekte der Intensität auf die Latenz erzeugt werden (Irvine et al. 1995, 2001). Dieser sog. Zeit-Intensitäts-Austausch („time-intensity-trading“) konnte sowohl psychoakustisch bei

Menschen (David et al. 1959; Hafer & Jeffress 1968; Young & Levine 1977), als auch physiologisch in der LSO von Fledermäusen (Park et al. 1996, 1997), Katzen (Joris & Yin 1995) und Ratten (Irvine et al. 2001) festgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass diese Laufzeitunterschiede experimentell durch gegenläufige ITDs kompensiert werden können. Wie aus diesen Arbeiten weiter hervorgeht, können daher auch hochfrequente, IID-sensitive LSO-Neurone eine ITD-Sensitivität aufweisen, wenn sie mit sehr kurzen Klick-Signalen (ca. 100  $\mu$ s lange Rechteckpulse; Irvine et al. 2001) oder sinoidal amplitudenmodulierten Signalen (SAM; Batra et al. 1997a,b; Joris & Yin 1995) oder frequenzmodulierten Signalen (FM) stimuliert werden (Park et al. 1996). Es ist allerdings sehr unwahrscheinlich, dass diese ITDs auch zur Lokalisation einer Schallquelle genutzt werden können. Wenn man bedenkt, dass das Austauschverhältnis von Intensität gegen Zeit ca. 50  $\mu$ s / dB SPL beträgt (Park et al. 1996; Pollak 1988), und selbst in Fledermäusen, die einen sehr kleinen Ohrabstand aufweisen, IIDs von bis zu 40 dB SPL erreicht werden können (Harnischfeger et al. 1985; Pollak 1988), dann liegen diese ITDs mit Werten von bis zu 2 ms weit über den ITDs, die natürlich durch die Kopfgröße in den meisten Säugetieren erzeugt werden können (s.h. auch unten). Wie Grothe (2000) ausführt, legen Ergebnisse in der MSO von Fledermäusen (Harnischfeger et al. 1985, Grothe 1994) nahe, dass auch diese Neurone mittels des Zeit-Intensitäts-Austauschs eine Rolle bei der Schalllokalisierung spielen könnten. Wie Grothe (2000) daraus ableitet, könnte dieses Verhalten der Fledermaus-MSO-Neurone möglicherweise den Beginn der Evolution von ITD-Verarbeitung, wie sie jetzt bei tieffrequent hörenden Säugern zu finden ist, darstellen. Zur ausführlichen Diskussion der ITD-Verarbeitung in der Fledermaus-MSO siehe Kapitel 5.2.3.

Die ITD-Sensitivität der LSO-Neurone unterscheidet sich in mehreren Punkten von der ITD-Sensitivität der tieffrequenten MSO-Neurone. Gegeben durch die afferente Verschaltung der hochfrequenten LSO-Zellen, mit nur je einem monaural erregenden und monaural hemmenden Eingang (E/I-Typ) zeigen die ITD-Funktionen in der LSO im Gegensatz zur MSO nicht die Form des Spitzentyps („peak-type“) sondern des Taltyps („trough-type“), d.h. die „beste ITD“ ist nicht der Punkt maximaler Antwort (Spitzentyp) sondern der Punkt minimaler Antwort (Taltyp). Wie bereits erwähnt, basiert die ITD-Sensitivität tieffrequenter MSO-Neurone auf der zeitlichen Integration phasengekoppelter Eingänge und damit auf der Analyse der zeitlichen Feinstruktur tieffrequenter Schallwellen. Diese Art der Analyse ist in hochfrequenten LSO-Neuronen nicht möglich, da eine Phasenkopplung an das Reintonsignal nur bei Frequenzen bis ca. 2 kHz erfolgen kann. Eine ITD-Sensitivität von LSO-Neuronen kann sich daher nur durch transiente



Einschalteffekte sehr kurzer Signale (Klicks) oder durch eine Phasenkopplung der Eingänge an die niedrige Frequenz der Umhüllenden des modulierten hochfrequenten Signals (SAM) ergeben und nicht aus einer Analyse der Feinstruktur der unterliegenden Frequenz. Daneben liegt die Grenze des Frequenzbereiches in welchem eine Phasenkopplung bei SAM-ITDs beobachtet werden konnte ungefähr 1 kHz unterhalb des Grenzbereiches in der MSO. Während in der MSO der Wüstenrennmaus (Brand et al. 2002; Spitzer & Semple 1995) und der Katze (Yin & Chan 1990) eine Phasenkopplung zu Reintönen bis ca. 1,8 kHz beobachtet werden konnte, zeigen die LSO-Neurone in der Katze (Joris 1996) und in der Wüstenrennmaus (T. Park nicht publizierte Daten) jenseits einer Modulationsfrequenz von 800 Hz praktische keine Phasenkopplung und damit auch keine ITD-Sensitivität mehr. Im Vergleich zur klassischen Reinton-IID-Sensitivität hochfrequenter LSO-Neurone, ist die Sensitivität für SAM-ITDs und damit die räumliche Auflösung in der Katze zudem ungefähr um den Faktor vier niedriger (Joris & Yin 1995). Wie Verhaltensarbeiten nahelegen, existiert bei Menschen ein Perzept für Umhüllenden-ITDs, allerdings ist dieses im Vergleich zum Perzept einer tieffrequenten Reinton-ITD ca. 10-fach (Bernstein 2001) schwächer (Bernstein & Trahiotis 1985; Henning 1974a,b; Trahiotis & Bernstein 1986). Auch scheint die Relevanz der Umhüllenden-ITDs bei der Lokalisation einer hochfrequenten Schallquelle unter Freifeldbedingungen eher von untergeordneter Bedeutung zu sein (s.h. den Übersichtsartikel Wightman & Kistler 1992).

Wie die ITD-Verarbeitung tieffrequenter Reintöne in der MSO, so benötigt auch die eben diskutierte Umhüllenden-ITD-Sensitivität in der LSO eine präzise zeitliche Abstimmung des erregenden und hemmenden Eingangs. Auch in der LSO müssen sowohl eine phasengekoppelte Inhibition als auch eine ebensolche Erregung zeitlich genau interagieren um die ebenfalls zyklische Taltyp-ITD-Funktion zu erzeugen. Wie bereits erwähnt, liegt das Limit der Phasenkopplung zu SAM-Stimuli in der LSO bei einer Modulationsfrequenz von ca. 800 Hz und liegt damit ca. 1 kHz unterhalb der in der MSO beschriebenen Grenze, d.h. die benötigte Zeitauflösung in der LSO müsste im Bereich weniger Millisekunden liegen, wogegen in der MSO eine Zeitauflösung im  $\mu$ s-Bereich etabliert werden muss. Wenn man diesen Unterschied unter dem Gesichtspunkt der zeitlichen Präzision der Hemmung betrachtet, könnte man daher zu dem Schluss kommen, dass die glycinergen Eingänge zu LSO-Neuronen zwar eine sehr gute, aber keine so exquisite Zeitauflösung wie MSO-Neurone benötigen. Dies wiederum könnte die beobachteten Unterschiede in der anatomischen Verteilung glycinерger Synapsen an MSO- und LSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus erklären. Interessanterweise zeigen elektronenmikroskopische Untersuchungen auch im medialen Arm der LSO bei Katzen

(Cant 1984) und Meerschweinchen (Helfert et al. 1992) eine räumliche Trennung der hemmenden und erregenden Synapsen über Somata und Dendriten der fusiformen LSO-Neurone. Allerdings ist diese räumliche Trennung im Vergleich zur MSO der Wüstenrennmaus deutlich weniger ausgeprägt. Basierend auf morphologischen Kriterien (Cant 1984; zur Signifikanz dieser Kriterien s.h. Kapitel 5.2.1) und durch Immun-Elektronenmikroskopie (Helfert et al. 1992) finden beide Arbeiten inhibitorische Synapsen hauptsächlich an den Somata und den wenig verzweigten Hauptästen der Dendriten in der Nähe der Zellkörper (proximale Dendriten), wogegen sich erregende Synapsen zum Großteil an den stark verzweigten distalen Dendritenästen fanden. Das Verhältnis der erregenden und hemmenden Synapsen in den einzelnen Bereichen der LSO-Zellen wird allerdings in beiden Studien etwas unterschiedlich gewichtet. Während Cant (1984) am Soma und den proximalen Dendriten nahezu ausschließlich inhibitorische Synapsen beschreibt, berichten Helfert et al. (1992) an Somata und proximalen Dendriten ein Verhältnis hemmender zu erregenden Synapsen von 2:1, an distalen Dendriten wiederum kehrt sich dieses Verhältnis um. Möglicherweise liegen die Unterschiede zwischen beiden Studien in den verschiedenen Methoden der Definition des Synapsentyps begründet, wobei Helfert et al. (1992) durch immunhistochemische Färbung für die Neurotransmitter Glycin, Glutamat und GABA den Synapsentyp wahrscheinlich genauer bestimmen konnten als Cant (1984), die nur aufgrund morphologischer Kriterien wie Vesikelform den Synapsentyp definierte. Eine solche räumliche Beschränkung der inhibitorischen Synapsen, wie sie an fusiformen LSO-Neuronen der Katze und des Meerschweinchens zu finden ist, konnte in der vorliegenden Arbeit mit lichtmikroskopischer (LM) Immunhistochemie an LSO-Neuronen der Wüstenrennmaus nicht bestätigt werden. Die qualitativ ermittelte Verteilung von Gephyrin- und Glycinrezeptorclustern weist eher auf eine homogene Verteilung der glycinergen Synapsen hin. Da, wie oben erwähnt, auch LSO-Neurone der Wüstenrennmaus eine vergleichbare SAM-ITD-Sensitivität zeigen und daher ebenfalls eine zeitlich präzise Inhibition benötigen würden, ist es nicht auszuschließen, dass auch bei LSO-Neuronen der Wüstenrennmaus eine solche Verteilung auftreten könnte. Möglicherweise sind die extrem distalen Bereiche der Dendriten auch in der LSO der Wüstenrennmaus nahezu frei von inhibitorischen Synapsen. Da aber bei der Untersuchung der LSO-Neurone keine Gegenfärbung der Dendriten mit MAP2 durchgeführt wurde, ist es schwer auf Einzelzellebene zu beurteilen wie sich die Synapsen an individuellen Neuronen verteilen. Es wäre daher möglich, dass es sich bei den markierten Dendritenstücken nur um die proximalen Hauptäste handelt, was im Einklang mit den Katzen- und Meerschweinchendaten stehen würde. Da zudem die Beschränkung

der Verteilung glycinerger Synapsen nicht dasselbe Ausmaß wie in der MSO erreicht, könnte sie möglicherweise durch die hier durchgeführte rein qualitative Analyse nicht erkannt werden. Eine Quantifizierung auf Einzelzellniveau müsste hier näheren Aufschluss bringen. Eine Immun – Elektronenmikroskopische Untersuchung mit Gephyrinfärbung in der LSO der Wüstenrennmaus (Korada & Schwartz 1999) kann jedoch die LM-Befunde der vorliegenden Arbeit bestätigen, sie finden nahezu die gesamte Membranfläche der LSO-Neurone mit positiv markierten, inhibitorischen Synapsen bedeckt (Korada & Schwartz 1999). Die Aussagen dieser Studie sind allerdings ebenfalls nur qualitativer Natur, zudem wurden nur Wüstenrennmäuse bis P14, also nur bis zwei Tage nach Hörbeginn untersucht. Es ist daher nicht auszuschließen, dass sich die Verteilung der Synapsen bis zur Ausreifung des Hörsystems nach P21 noch verändert und sich in Tieren mit adultem Hörsystem anders darstellt (s.h. auch die Entwicklung in der MSO unter Kapitel 5.3). Es bleibt daher offen, ob die diskutierten Unterschiede in der Art der räumlichen Anordnung von erregenden und hemmenden Synapsen, wie sie in der LSO von Katzen, Meerschweinchen und Wüstenrennmäusen vorliegen, auf die verschiedenen Spezies oder auf die verschiedenen Methoden zurückzuführen sind. Nach den diskutierten Befunden erscheinen allerdings verschiedene Methoden als der wahrscheinlichere Grund in Betracht zu kommen. Weitere vergleichende anatomische Studien an Säugetieren, deren LSO-Neurone eine Umhüllenden-ITD-Sensitivität aufweisen, könnten hier zur Klärung der Frage beitragen, ob eine räumliche Trennung der hemmenden und erregenden Synapsen eventuell mit der Funktion der LSO-Zellen in der ITD-Verarbeitung in Verbindung steht. Sollte sich eine räumliche Beschränkung der inhibitorischen Synapsen auch in der LSO bestätigen, so könnte man zusammen mit den Ergebnissen der MSO daraus ableiten, dass sich durch eine spezifische räumliche Anordnung die zeitliche Genauigkeit inhibitorischer Eingänge funktionell verbessern lässt. Da die geforderte Kinetik der Inhibition bei MSO-Neuronen im Bereich hunderter  $\mu$ s liegt, könnte sie somit nur durch eine extreme Konzentration der glycinergen Synapsen am Soma erreicht werden. Für LSO-Neurone wäre demnach eine solche Differenzierung ebenfalls von Vorteil, jedoch würde die im Bereich weniger Millisekunden liegende notwendige Kinetik der Inhibition keine so massive Form der räumlichen Beschränkung erfordern.

Im Gegensatz zu Neuronen der MSO und LSO, scheinen SPN-Zellen nicht an der Verrechnung von Signalparametern im Kontext von Schalllokalisation im Azimut beteiligt zu sein. Sie scheinen eher als generelle Filter für zeitliche Strukturen im Schallsignal zu fungieren (Behrend et al. 2002; Kulesza et al. 2003). Auch die Zellen des SPN erhalten zeitlich präzise binaural erregende Eingänge aus dem VCN, im Gegensatz zu MSO- und

LSO-Zellen jedoch hauptsächlich aus dem PVCN durch Octopuszellen und Multipolar- / Stern-Zellen (Friauf & Ostwald 1988; Schofield 1995; Thompson & Thompson 1991). Zusätzlich erhalten SPN-Neurone, wie MSO- und LSO-Neurone, denselben zeitlich präzisen, contralateral getriebenen inhibitorischen Eingang durch den ipsilateralen MNTB (Banks & Smith 1992; Kuwabara et al. 1991; Sommer et al. 1993). Der erregende Eingang der Octopuszellen zeichnet sich durch zeitlich sehr präzise phasische Antworten mit nur einem Aktionspotential auf den Beginn des Stimulus (Golding et al. 1995) und durch eine Phasenkopplung an die Umhüllende von SAM-Stimuli bis zu 800 Hz aus (Rhode & Greenberg 1994; Rhode et al. 1983a,b). Wie bereits mehrfach erwähnt, gewährleistet der inhibitorische MNTB-Eingang eine exzellente Zeitauflösung, beispielsweise Phasenkopplung bis zu ca. 1,5 kHz (Paolini et al. 2001; Smith et al. 1998). Im Gegensatz zu MSO- und LSO-Neuronen, spiegelt sich die hohe zeitliche Präzision der Eingänge jedoch nicht im selben Maße im Antwortverhalten der SPN-Neurone wieder. Wie Behrend et al. (2002) *in vivo* im SPN der Wüstenrennmaus zeigen können, erhalten nur ca. 40% der Zellen überhaupt binaurale Eingänge und wären damit potentiell in der Lage eine Sensitivität zu ITDs und IIDs zu zeigen. Aus ihren Ergebnissen geht allerdings hervor, dass diese SPN-Neurone, wenn überhaupt, nur eine sehr schwache und nicht verhaltensrelevante Sensitivität zu ITDs und IIDs zeigen. Im Fall von ITDs schließt dies sowohl Reinton- als auch SAM-ITD-Sensitivität ein (Behrend et al. 2002). Ein Teil (ca. 40%) der binauralen SPN-Zellen zeigt eine zeitliche Präzision bei der Verarbeitung von SAM-Stimuli, welcher der des Octopuszelleingangs entspricht. So antworten diese Zellen ebenfalls mit sehr geringer Variabilität nur am Beginn des Stimulus und zeigen eine Phasenkopplung zu der Einhüllendenfrequenz der SAM-Stimuli, in einigen Zellen bis zu einer Modulationsfrequenz von 1000 Hz (Behrend et al. 2002). Was die zeitliche Präzision glycinerge Inhibition im Hinblick auf die SAM-Filtereigenschaften bei SPN-Neuronen betrifft, zeigen sich interessante Unterschiede zu MSO- und LSO-Neuronen. Denn wird die glycinerge Inhibition bei SAM-sensitiven SPN-Neuronen pharmakologisch durch iontophoretische Applikation von Strychnin blockiert, so erhöht sich in vielen Neuronen die Modulationsgrenzfrequenz der sie noch signifikant phasengekoppelt folgen können im Vergleich zu Kontrollbedingungen deutlich, beispielsweise von ca. 500 Hz auf über 1000 Hz (Behrend et al. 2002). Wenn nun unter Kontrollbedingungen, also mit intakter MNTB-Inhibition, die Modulationsgrenzfrequenz unterhalb der durch die erregenden Eingänge möglichen liegt, dann müsste man annehmen, dass die Kinetik der Inhibition bei SPN-Zellen nicht optimal ist. Wenn man weiter bedenkt, dass die MNTB-Zellen selbst in der Lage sind hohen Modulationsfrequenzen zu folgen, dann bleiben im Grunde nur zwei

mögliche Erklärungen für die langsamere Kinetik der Inhibition bei SPN-Neuronen. Eine Möglichkeit könnte dabei in einer Konvergenz der Projektionen vieler MNTB-Zellen zu einer SPN-Zelle liegen. Bedingt durch eine Vielzahl an Eingängen verschiedener Zellen, welche zeitlich leicht zueinander verschoben an der SPN-Zelle eintreffen, würde sich die zeitliche Korrelation der Inhibition verringern. Dies könnte dazu führen, dass es bereits bei niedrigeren Modulationsfrequenzen zu einer zeitlichen Summation der inhibitorischen Potentiale kommt. Ab einer bestimmten Modulationsgrenzfrequenz würde so aus einer phasengekoppelten Inhibition eine tonische Inhibition mit langsamerer Kinetik entstehen. Die zweite Erklärungsmöglichkeit für eine langsamere Kinetik der Inhibition bei SPN-Zellen könnte nun in der räumlichen Anordnung der glycinergen Synapsen liegen. Wie in den Ergebnissen gezeigt, verteilten sich glycinerge Synapsen an SPN-Neuronen in der Wüstenrennmaus diffus über Somata und gesamte Dendriten. Vorausgesetzt, die im Zusammenhang mit MSO und LSO diskutierte Korrelation zwischen der physiologisch notwendigen Kinetik der Inhibition und dem Ausmaß einer räumlichen Beschränkung glycinergere Eingänge trifft zu, dann würde der SPN mit einer homogenen Verteilung der glycinergen Eingänge und einer zugleich eher langsamen Kinetik der Inhibition ins Bild passen. Durch die homogene Anordnung könnte es zu vermehrter zeitlicher wie räumlicher Summation der inhibitorischen Potentiale kommen, was zu einem „Verschmieren“ der zeitlichen Präzision der Inhibition und damit zu einer tonischen und nicht mehr phasengekoppelten Inhibition führen könnte. Daraus ließe sich der Schluss ziehen, dass eine räumliche Beschränkung der inhibitorischen Eingänge, wie sie in der MSO vorliegt, möglicherweise entscheidend für die notwendige, hohe Kinetik der Inhibition bei der ITD-Verarbeitung ist. Da alle drei Nuclei (MSO, LSO, SPN) ihre inhibitorischen Eingänge aus einer homogenen Population von MNTB-Zellen erhalten, also gleiche Grundvoraussetzungen haben müssten, könnte die in den Zielzellen funktionell notwendige Kinetik der Inhibition möglicherweise durch eine unterschiedliche räumliche Verteilung der Synapsen reguliert werden. Diese Hypothese würde durch die diskutierten Befunde aus den drei Nuclei unterstützt, von MSO über LSO zu SPN zeigen die Zellen eine Abstufung in der Zeitauflösung der Inhibition von extrem hoch (MSO) über hoch (LSO) zu mäßig hoch (SPN), eine nahezu perfekte Entsprechung findet die physiologische Abstufung in der räumlichen Anordnung der glycinergen Synapsen, von extremer (MSO) über leichter (LSO) zu keiner (SPN) räumlichen Beschränkung.

Interessanterweise, stellen auch MSO-Neurone von Fledermäusen ähnlich präzise Filter für die zeitliche Struktur von Schallsignalen dar (Grothe 1994; Grothe et al. 1997, 2001). So zeigen sie beispielsweise, wie die SPN-Neurone der Wüstenrennmaus, eine

ausgeprägte Tiefpassfilter-Charakteristik in ihrem Antwortverhalten auf SAM-Stimuli (Grothe 1994; Grothe et al. 1997, 2001). Wie weiter gezeigt werden konnte, spielt die, durch den MNTB vermittelte, glycinerge Inhibition dabei auch in der MSO der Fledermaus eine wichtige Rolle bei der Etablierung dieser zeitlichen Filtereigenschaften (Grothe 1994; Grothe et al. 1997, 2001). Zur ausführlichen Diskussion der Anatomie und Physiologie glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen der Fledermaus siehe Kapitel 5.2.3.

### **5.2.2 Säugetiere mit einem auf die Analyse tiefer Frequenzen spezialisierten Hörsystem**

Die Ergebnisse legen einen direkten Zusammenhang zwischen der spezifischen räumlichen Anordnung der inhibitorischen Eingänge und der Funktion der MSO-Neurone in der ITD-Verarbeitung bei Tieren mit spezialisiertem tieffrequentem Hören nahe. Sollte diese Hypothese zutreffen, dann würde man erwarten, eine Kompartimentierung der glycinergen Eingänge auch an den MSO-Neuronen anderer Säugetiere zu finden, deren Hörsystem einerseits ebenfalls gut an die Analyse tiefer Frequenzen angepasst ist, und die andererseits auch eine hohe Zeitauflösung bei der ITD-Verarbeitung zeigen. Zwei klassische Beispiele für Säugetiere die in diese Kategorien fallen sind die Katze und der Chinchilla. Wie Wüstenrennmäuse, so zeigen auch Katzen und Chinchillas, in ihren Verhaltensaudiogrammen eine deutliche Repräsentation tiefer Frequenzen. Im Audiogramm der Katze liegen die tiefsten wahrgenommenen Frequenzen bei ca. 45 Hz (75 dB SPL; Heffner & Heffner 1985), wobei die niedrigsten Schwellen (< 10 dB SPL) in einem Bereich von ca. 250 Hz – 32 kHz erreicht werden (Heffner & Heffner 1985; Neff & Hind 1955). Ähnliche Werte wurden auch für den Chinchilla gemessen. Die tiefsten wahrnehmbaren Frequenzen liegen im Audiogramm des Chinchillas bei ca. 32 Hz (82 dB SPL, Heffner & Heffner 1991) und die niedrigsten Schwellen (< 10 dB SPL) werden in einem Bereich zwischen ca. 250 Hz – 16 kHz erreicht (Dallos et al. 1978; Heffner & Heffner 1991). Diese Charakteristika des verhaltensrelevanten Frequenzbereiches beider Arten deckt sich dabei mit dem Audiogramm der Wüstenrennmaus. Die tiefsten wahrnehmbaren Frequenzen liegen in der Wüstenrennmaus bei unter 100 Hz (40 dB SPL; Dallos et al. 1978; Ryan 1976) und die niedrigsten Schwellen (< 10 dB SPL) werden zwischen ca. 500 Hz und 20 kHz erreicht (Dallos et al. 1978; Ryan 1976). Daneben geht aus psychophysischen Arbeiten hervor, dass sowohl die Katze (Casseday & Neff 1973), als auch der Chinchilla (Heffner et al. 1994) ITDs zur Lokalisation tieffrequenter Reintöne nutzen können. Desweiteren sind die MSO-Neurone der Katze und des Chinchillas, wie elektrophysiologische *in vivo* Untersuchungen zeigen,

in der Lage ITDs im  $\mu$ s-Bereich mit hoher Präzision aufzulösen (Chinchilla: Langford 1984; Katze: Yin & Chan 1990).

Tatsächlich konnten EM-Studien in der MSO der adulten Katze (Clark 1969a) und des adulten Chinchillas (Perkins 1973) eine spezifische räumliche Anordnung von bestimmten, morphologisch identifizierten Synapsentypen zeigen, die mit der hier immunhistochemisch beschriebenen Verteilung bei der Wüstenrennmaus eine hohe Übereinstimmung aufweist. Basierend auf einer morphologischen Klassifizierung von Gray (1959) lassen sich präsynaptische Endigungen nach der Form der synaptischen Vesikel und der Symmetrie der synaptischen Membranspezialisierungen in zwei Gruppen einteilen. Die sog. Gray-Typ-1 Synapsen enthalten demnach große runde Vesikel und weisen asymmetrische Membranspezialisierungen auf, die Gray-Typ-2 Synapsen enthalten im Vergleich zu Typ-1 kleinere synaptische Vesikel deren Form je nach Fixierung von flach-oval über pleomorph bis hin zu rund variieren kann und weisen symmetrische Membranspezialisierungen auf (Gray 1959). Aufgrund von Untersuchungen an Motoneuronen im Rückenmark (Bodian 1966) und Purkinjezellen im Cerebellum (Uchizono 1967) wurden die Gray-Typ-1 Synapsen als exzitatorisch und die Gray-Typ-2 Synapsen als inhibitorisch klassifiziert. Auch anterograde Läsionsstudien im auditorischen Hirnstamm der Katze (Kiss & Majorossy 1983; Lindsey 1975) und des Chinchillas (Perkins 1973) legen diese Interpretation nahe, denn nach Läsion des AVCN degenerieren an MSO-Neuronen nur Axone, die präsynaptische Boutons des Gray-Typ-1 bilden (Kiss & Majorossy 1983; Lindsey 1975; Perkins 1973), also höchstwahrscheinlich die erregenden Synapsen die durch Axone der SBCs gebildet werden (Kiss & Majorossy 1983). Gray-Typ-2 Synapsen werden dagegen von diesem Eingriff nicht beeinflusst (Kiss & Majorossy 1983; Lindsey 1975; Perkins 1973), was dafür sprechen würde, dass sie nicht von Axonen aus dem AVCN gebildet werden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Typ-2 Synapsen zu MSO-Neuronen der Katze und des Chinchillas von Axonen des MNTBs und LNTBs gebildet werden und daher Glycin als Neurotransmitter ausschütten (Kiss & Majorossy 1983). Bestätigt wird dieser Zusammenhang zwischen der Morphologie des Terminals und der Art des Neurotransmitters zudem durch Immun-Elektronenmikroskopie im AVCN (Hackney et al. 1996) und der LSO (Helfert et al. 1992) des Meerschweinchens. In beiden Studien sind Typ-1 Synapsen mit glutamatergen Vesikeln und Typ-2 Synapsen mit glycinergen / GABAergen Vesikeln korreliert. In ihrer Verteilung zeigten die höchstwahrscheinlich inhibitorischen Synapsen vom Gray-Typ-2 sowohl in der Katze (Clark 1969a), als auch im Chinchilla (Perkins 1973) eine spezifische räumliche Beschränkung auf die Somata und den extrem proximalen Beginn der Dendriten

von MSO-Neuronen. Dagegen waren an den Dendriten in beiden Studien nahezu ausschließlich (84% Katze, Clark 1969a; 85% Chinchilla, Perkins 1973) Synapsen des Gray-Typ-1 zu finden, lediglich rund 15% der Synapsen zeigten Merkmale von Gray-Typ-2 Synapsen. Interessanterweise beschreibt Perkins (1973) in der MSO des Chinchillas, im Gegensatz zur MSO der Katze (Clark 1969a,b; Lindsey 1975), noch einen dritten Synapsentyp, der sich einerseits durch vergleichsweise kleine präsynaptische Boutons mit sehr kleinen, runden synaptischen Vesikel auszeichnet und andererseits nach Läsion des AVCN nicht degeneriert, also nach der oben genannten Definition ebenfalls inhibitorisch sein müsste. Es sind nun gerade diese Synapsen des dritten Typs welche den 15%igen Anteil der nicht Typ-1 Synapsen an den Dendriten der MSO-Neurone des Chinchillas stellen (Perkins 1973). Diese Dreiteilung der Synapsentypen an MSO-Neuronen im Chinchilla könnte für die funktionelle Interpretation der räumlichen Beschränkung glycinergen Synapsen, auf die im weiteren Verlauf noch näher eingegangen wird, möglicherweise von Bedeutung sein (s.h. Kapitel 5.2.4).

Die Verteilung morphologisch identifizierter inhibitorischer Synapsen zu MSO-Neuronen in diesen ITD nutzenden Tieren entspricht damit im wesentlichen der hier durch immunhistochemische Methoden (Licht- und Elektronenmikroskop) gezeigten, räumlich beschränkten Verteilung in der adulten Wüstenrennmaus. In der vorliegenden Arbeit wurde aus mehreren Gründen auf eine morphologische Klassifizierung der Synapsentypen verzichtet. So diskutieren mehrere Studien eine Abhängigkeit zwischen den morphologischen Kriterien der Vesikelform, Form der Terminalien, und Symmetrie der synaptischen Membranspezialisierungen von externen Faktoren wie beispielsweise Art und Osmolarität des Fixativs. Speziell Paraformaldehyd-basierte Fixative mit niedriger Osmolarität könnten danach die Morphologie nachhaltig beeinflussen (Cant 1984; Lindsey 1975; Perkins 1973; Schwartz 1980; Valdivia 1971; Vater 1995). Zudem war dies auch nicht zwingend notwendig, da durch den immunhistochemischen Nachweis von Gephyrin ein, im Gegensatz zu morphologischen Merkmalen, weitaus zuverlässigeres Kriterium zur Definition inhibitorischer Synapsen zur Verfügung stand. Betrachtet man nur die Vesikelformen der in der Arbeit immunhistochemisch identifizierten präsynaptischen glycinergen Boutons (ovoid, klein rund, pleomorph), so unterscheiden sie sich trotz Paraformaldehyd-basierter Fixierung nicht bedeutend von den Vesikelformen der Gray-Typ-2 Synapsen. Auch die nicht immunhistochemisch markierten und daher vermutlich erregenden Synapsen zeigten eine Tendenz große runde Vesikel zu enthalten, was dem Gray-Typ-1 entsprechen würde. Es erscheint daher zulässig die immunhistochemisch identifizierten Synapsentypen dieser Arbeit mit den morphologisch



identifizierten Typen in der Katze und im Chinchilla zu vergleichen.

Da die EM-Analyse nur qualitativ und nicht quantitativ durchgeführt wurde, ist es jedoch nicht ohne weiteres möglich die quantitativen Angaben von Clark (1969a) und Perkins (1973) zur Synapsenverteilung direkt mit den EM-Ergebnissen dieser Arbeit in Beziehung zu setzen. Ein Problem in diesem Zusammenhang liegt dabei vorallem in der Beurteilung des 15%igen Anteils inhibitorischer Synapsen an distalen Dendriten, wie ihn Clark (1969a) und Perkins (1973) übereinstimmend beschreiben, denn qualitativ zeigte die EM-Verteilung Gephyrin-positiver Synapsen in der Wüstenrennmaus nur einen sehr geringen Anteil an den distalen Dendriten. Wie hoch der genaue Anteil dieser markierten, inhibitorischen Synapsen an den Dendriten in der Wüstenrennmaus tatsächlich ist, kann erst durch eine systematische Quantifizierung von EM-Serienschnitten in weiteren Experimenten geklärt werden, was für sich eine Studie großen Umfangs darstellt und daher in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt wurde. Betrachtet man allerdings die lichtmikroskopische Quantifizierung der Verteilung glycinерger Eingänge in der Wüstenrennmaus, so lag die Dichte von glycinergen Boutons und von Gephyrin- sowie Glycinrezeptorclustern an den distalen Dendriten der adulten MSO-Neurone bei nur ca. 7 – 17%, also ziemlich genau im Bereich der Werte, die für morphologisch identifizierte inhibitorische Synapsen in der Katze und dem Chinchilla beschrieben wurden. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass eine EM-Quantifizierung in der Wüstenrennmaus ein analoges Ergebnis liefern würde.

Die einzige weitere EM-Studie an der MSO der Wüstenrennmaus kommt in ihrer, auf den erwähnten morphologischen Kriterien basierenden, Quantifizierung zu einem etwas höheren Anteil inhibitorischer Synapsen an den Dendriten (ca. 25 – 30%, Russell & Moore 2002). Das Ergebnis dieser Quantifizierung ist aber mit einer gewissen Skepsis zu betrachten. So wurde nicht die absolute Zahl an Synapsen bestimmt, sondern nur ein Flächenindex, welcher angibt wieviel Prozent der Membran durch einen bestimmten Synapsentyp belegt wird. Diese Messung kann aber irreführend sein, da, wie oben erwähnt, auch die Form des präsynaptischen Terminals durch externe Faktoren (Fixativ, Osmolarität) beeinflusst werden kann. Dadurch könnte unter Umständen auch die Größe der Terminalien differentiell verändert werden, was wiederum erheblichen Einfluss auf eine derartige Flächenanalyse haben dürfte. Desweiteren scheinen in dieser Studie (Russell & Moore 2002) die Membranen der Somata und Dendriten nur zu ca. 50% von präsynaptischen Terminalien bedeckt zu sein, ein Wert der im Vergleich zu allen anderen EM-Studien an MSO-Neuronen als extrem niedrig erscheint. So findet beispielsweise Schwartz (1980) in der MSO der Katze ca. 85% der Membranen von MSO-PC-Zellen mit

Terminalien bedeckt. Obwohl diese Art der Messung weder in der vorliegenden Arbeit noch in weiteren Untersuchungen der Katzen-MSO (Clark 1969a,b; Kiss & Majorossy 1983; Lindsey 1975), der Chinchilla-MSO (Perkins 1973) und der MSO des Frettchens (Brunso-Bechtold et al. 1990, 1992) durchgeführt wurde, so ist doch in allen Arbeiten konsistent eine extrem dichte Reihung der Synapsen entlang der Membranen beschrieben. Möglicherweise ging in die Studie von Russell & Moore (2002) auch ein hoher Anteil von MSO-NPC-Zellen ein, denn wie Schwartz (1980) weiter zeigt, sind auch in den Marginalzellen der Katzen-MSO nur ca. 48% der Membranfläche von Terminalien bedeckt und sie erhalten deutlich mehr inhibitorische Eingänge auf den Dendriten als MSO-PC-Zellen. Diese NPC-Zellen werden nur monaural durch einen CN innerviert (Kiss & Majorossy 1983; Lindsey 1975; Perkins 1973; Schwartz 1980) und sind daher nicht wie die PC-Zellen an der binauralen Verarbeitung von ITDs beteiligt (Spitzer & Semple 1995). Daher dürften die Aussagen von Russell & Moore (2002) höchstwahrscheinlich nicht mit den Aussagen der vorliegenden und der diskutierten Arbeiten aus Katze und Chinchilla, welche nur oder hauptsächlich die ITD-sensitiven MSO-PC-Zellen untersuchten, vergleichbar sein.

Da sowohl Wüstenrennmäuse, als auch Katzen und Chinchillas, eine räumliche Beschränkung der glycinergen Eingänge auf die Somaregion zeigen, könnte dies eine spezifische anatomische Anpassung der inhibitorischen Projektionen zu MSO-Neuronen in Säugetieren mit einem auf die Analyse tiefer Frequenzen spezialisiertem Hörsystem darstellen. Es ist daher auch sehr wahrscheinlich, dass diese spezifische Anpassung direkt an die Funktion der MSO-Zellen in der ITD-Auswertung gekoppelt ist.

### **5.2.3 Säugetiere mit einem eher hochfrequent abgestimmten Hörsystem**

Sollten die in den Kapiteln 5.2.1. und 5.2.2 diskutierten Überlegungen zur Korrelation einer spezifischen räumlichen Anordnung glycinerger Synapsen mit der funktionell notwendigen Zeitauflösung bei der ITD-Verarbeitung in der MSO zutreffen, dann würde man eine solche Anpassung nicht in den Säugetieren erwarten, deren Hörsystem nicht auf die Wahrnehmung tiefer Frequenzen spezialisiert ist und die daher höchstwahrscheinlich keine ITDs zur Schalllokalisation nutzen. Wie aus den präsentierten Ergebnissen hervorgeht, findet sich an MSO-Zellen der Ratte keine Kompartimentierung der inhibitorischen, glycinergen Eingänge. Sowohl in adulten Ratten, als auch in jungen Ratten vor Hörbeginn verteilten sich die glycinergen Synapsen homogen über die Somata und gesamten Dendriten.

Die MSO der Ratte erhält, wie in fast allen Säugetieren, binaural erregende Eingänge von SBCs aus dem AVCN (Friauf & Ostwald 1988; Harrison & Irving 1966a,b) und vom contralateralen Ohr getriebene inhibitorische glycinerge Eingänge aus dem ipsilateralen MNTB (Casey & Feldman 1985; Friauf et al. 1997; Sommer et al. 1993). Ein direkter anatomischer Nachweis einer inhibitorischen Projektion vom ipsilateralen LVPO (homolog zu LNTB; Kandler & Friauf 1993) zur MSO der Ratte ist bisher nicht bekannt. Da eine solche Projektion aber bisher in verschiedenen Nagetieren (Wüstenrennmaus: Cant & Hyson 1992, Kuwabara & Zook 1992; Maus: Kuwabara & Zook 1992) und Fledermäusen (Schnurrbartfledermaus: Kuwabara & Zook 1992) gezeigt werden konnte, ist es allerdings wahrscheinlich, dass auch in der Ratte eine solche, vom ipsilateralen Ohr getriebene glycinerge Projektion existiert. Diese Annahme wird durch eine *in vivo* elektrophysiologische Arbeit unterstützt, die eine ipsilateral getriebene Inhibition zu MSO-Neuronen der Ratte nachweisen konnte (Inbody & Feng 1981). Trotz der im Prinzip dafür geeigneten Eingänge sprechen mehrere Argumente gegen eine Funktion der Ratten-MSO-Neurone in der initialen Verarbeitung von Reinton-ITDs.

Im Gegensatz zu Wüstenrennmäusen, Katzen und Chinchillas scheint das Hörsystem der Ratte nicht spezifisch an die Wahrnehmung tiefer Frequenzen sondern eher an die Verarbeitung höherer Frequenzen angepasst zu sein (Friauf 1992; Kelly & Masterton 1977; Zheng et al. 1992). Wie aus Audiogrammen hervorgeht, erstreckt sich der verhaltensrelevante Frequenzbereich bei der Ratte von ca. 250 Hz bis zu 80 kHz (70 dB SPL; Kelly & Masterton 1977), wobei die niedrigsten Schwellen (< 10 dB SPL) in einem Bereich von ca. 4 kHz bis 45 kHz erreicht werden (Kelly & Masterton 1977; Zheng et al. 1992). Im Vergleich zu Spezialisten für tieffrequentes Hören wie die Wüstenrennmaus, deren niedrigste Schwellen (< 10 dB SPL) zwischen 0,5 kHz und 20 kHz liegen (Dallos et al. 1978; Ryan 1976), ist der sensitivste Abschnitt des Audiogramms bei der Ratte damit klar zu höheren Frequenzen verschoben. Mit ihrem eher hochfrequent abgestimmtem Hörbereich stellt die Ratte im Vergleich zu anderen Säugetieren keine Ausnahme, sondern eher den Regelfall dar. Wie Kelly & Masterton (1977) zeigen können, erreicht das Audiogramm der Ratte eine sehr hohe Übereinstimmung mit einem gemittelten Audiogramm über 17 verschiedene Arten (s.h. auch Masterton et al. 1969). Abgesehen von wenigen Spezialisten für hochfrequentes Hören wie echoortende Fledermäuse und Delphine, deren Hörsystem auf die Wahrnehmung extrem hoher Frequenzen abgestimmt ist (obere Grenze bis zu 130 kHz; Koay et al. 1997, 1998; Long & Schnitzler 1975; Schmidt et al. 1990), und den bereits angesprochenen Spezialisten für tieffrequentes Hören wie Carnivore, Huftiere und

Wüstenbewohner (Heffner et al. 2001; Rosowski et al. 1999; s.h. auch die Übersichtsartikel Grothe 2000; Rosowski 1992; Webster & Plassmann 1992) könnte man daher folgern, dass die Ratte über eine Art „Standard-Säuger-Hörsystem“ verfügt, welches in seinen Eigenschaften als repräsentativ für die Mehrzahl von Säugetieren gelten müsste. Für Tiere deren Audiogramm, wie das der Ratte, eher im hochfrequenten Bereich liegt, scheint es daher nicht verhaltensrelevant zu sein, tiefe Frequenzen auszuwerten. Es erscheint daher auch als unwahrscheinlich, dass Ratten ITDs zur Lokalisation einer Schallquelle nutzen. Bestätigt werden diese Überlegungen durch physiologische Untersuchungen. So zeigen MSO-Neurone der Ratte bei Stimulation mit Reintönen oder Breitbandrauschen nur eine sehr begrenzte und nicht verhaltensrelevante ITD-Sensitivität (Inbody & Feng 1981). Entsprechend dem Audiogramm der Ratte (s.h. oben) konnten Inbody & Feng (1981) dabei auch nur MSO-Neurone charakterisieren die mit vergleichsweise hohen Schwellen (50 – 90 dB SPL) bevorzugt auf Frequenzen zwischen 2,2 kHz und 6,6 kHz antworteten. Bereits in ihrer Frequenzabstimmung unterscheidet sich die Ratten-MSO damit deutlich von der MSO tieffrequent hörender und ITDs nutzender Tiere wie Wüstenrennmaus, Katze und Chinchilla, deren Neurone eine markante Verschiebung ihrer Bestfrequenzen in den Frequenzbereich unterhalb von 2 kHz zeigen (Wüstenrennmaus: < 2 kHz: ca. 70%; Brand 2003; Katze: < 3 kHz: ca. 97%; Yin & Chan 1990; Chinchilla: < 1,8 kHz: ca. 80%; Langford 1984). Da eine Phasenkopplung der Eingänge zu fortlaufenden Reintönen im auditorischen System von Säugetieren nur bis zu einer Frequenz von ca. 2 kHz erfolgen kann (Joris et al. 1994a,b), scheint es folgerichtig, dass sich in MSO-Neuronen der Ratte keine Phasenkopplung und damit auch keine IPD / ITD-Sensitivität zu fortlaufenden Reintönen nachweisen lässt (Inbody & Feng 1981). Auch scheinen, trotz der im Prinzip dafür vorhandenen Eingänge (s.h. oben), nur ca. 55% der Ratten-MSO-Zellen überhaupt die, für den basalen Koinzidenzdetektormechanismus notwendigen, binaural erregenden Eingänge zu erhalten, wobei nur in ca. 12% der Neurone der ipsi- und contralaterale Eingang dieselbe Stärke aufweisen (Inbody & Feng 1981). Die Mehrzahl der Ratten-MSO-Neurone sind danach entweder rein durch contralaterale Erregung getrieben (ca. 45%; Inbody & Feng 1981) oder stark durch den contralateralen Eingang dominiert (ca. 39%; Inbody & Feng 1981). Die rein contralateral getriebenen Neurone der Ratten-MSO zeigen dabei interessanterweise ein I/E-Antwortverhalten, wie es sonst hauptsächlich in der LSO (als E/I-Typ) gefunden wird (Inbody & Feng 1981). Im Gegensatz dazu ist die Mehrheit der MSO-Neurone in der Wüstenrennmaus (ca. 60%; Brand 2003), der Katze (ca. 79%; Yin & Chan 1990) und des Chinchillas (ca. 91%; Langford 1984) binaural erregend

innerviert und nur wenige Neurone zeigen eine rein contralaterale Erregung (Brand 2003; Langford 1984; Yin & Chan 1990). Trotz der eben diskutierten Unterschiede in den grundlegenden Zelleigenschaften zwischen der Ratten-MSO und der MSO von Spezialisten für tieffrequentes Hören, zeigen doch einige wenige der binauralen Zellen der Ratte eine leichte ITD-Sensitivität zum Beginn des Stimulus (Inbody & Feng 1981), allerdings liegen nur ca. 10 – 25% des dynamischen Bereichs der ITD-Funktionen im verhaltensrelevanten Bereich der Ratte (ca. 150  $\mu$ s; s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2000). Diese Werte würden in etwa dem entsprechen, was die ITD-Funktionen in der MSO der Wüstenrennmaus nach iontophoretischer Blockade der glycinergen Inhibition durch Strychnin zeigen (ca. 21%; Brand et al. 2002). Wenn man bedenkt, dass der dynamische Bereich bei ITD-Funktionen von MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus im Normalfall zu ca. 80% im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs plaziert ist (Brand et al. 2002), dann erscheint es zumindest fraglich ob diese vergleichsweise geringe Änderung der Feuerrate, wie sie Ratten-MSO-Neurone aufweisen, überhaupt zur Lokalisation nutzbar ist. Interessanterweise zeigen die bereits erwähnten I/E-Neurone der Ratten-MSO aber eine für die MSO ungewöhnlich gute und eher der LSO entsprechende IID-Auflösung (Inbody & Feng 1981), die auch für das Tier zur Lokalisation nutzbar ist.

Die eben diskutierten Überlegungen zur Physiologie der Ratten-MSO lassen nun eine ganze Anzahl von möglichen Schlüssen zu. Das Audiogramm der Ratte, die vergleichsweise hohe Anzahl an nicht im strengen Sinn binaural innervierten Zellen und die niedrige, wenig verhaltensrelevante ITD-Sensitivität scheinen darauf hinzudeuten, dass die Funktion der Ratten-MSO im Gegensatz zur Wüstenrennmaus-MSO nicht primär in der Verarbeitung von Reinton-ITDs liegen kann. Die Ratte dürfte daher nicht auf die Wahrnehmung tiefer Frequenzen und die Analyse von ITDs zur Lokalisation einer Schallquelle angewiesen sein. Es scheint im Gegenteil viel wahrscheinlicher, dass sie die Analyse von IIDs nutzt, die immer dann entstehen, wenn die Wellenlänge des Schalles kleiner als der Ohrabstand ist. Für die Ratte mit ihrem vergleichsweise geringen Ohrabstand und einem auf die Analyse eher hoher Frequenzen abgestimmten Hörsystem, dürfte es somit kein Problem darstellen verhaltensrelevante Schallereignisse mittels IIDs zu lokalisieren. Im Umkehrschluss könnte man folgern, dass für die Ratte, im Gegensatz beispielsweise zur Wüstenrennmaus, kein evolutiver Druck durch den Lebensraum und damit keine Notwendigkeit bestand, ihr Hörsystem spezifisch an die Wahrnehmung tiefer Frequenzen und damit auch an die Auswertung von ITDs anzupassen. Anatomisch könnte man diese unterschiedlichen Strategien beispielsweise an der unterschiedlichen relativen Größe der MSO und LSO in beiden Spezies ablesen. Während im SOC der Ratte die LSO

eindeutig die dominierende Struktur darstellt, ist im SOC der Wüstenrennmaus dieses Verhältnis deutlich in Richtung der MSO verschoben. Auch strukturelle Anpassungen, wie das in allen wahrscheinlich ITDs nutzenden Tieren erkennbare, klar strukturierte dorso – ventrale Zellband, ist in der Ratten-MSO nur wenig ausgeprägt. Der Kern scheint daher nicht denselben Grad der Ordnung wie in der Wüsterenmmaus zu erreichen. Wenn man diesen Gedankengang fortführt, dann scheint auch die unterschiedliche Verteilung der glycinergen Synapsen an den MSO-Neuronen in Ratte und Wüstenrennmaus erklärbar. Während für MSO-Zellen der Wüstenrennmaus eine klare Notwendigkeit besteht eine  $\mu$ s-genaue Zeitauflösung in den inhibitorischen Eingängen zu erreichen, um die für sie wichtigen ITDs in einem verhaltensrelevanten Rahmen nutzen zu können, scheint dies für die Ratte nicht der Fall zu sein. Wenn nun die bereits in den vorangegangenen Kapiteln geäußerte Annahme zutrifft, dass die räumliche Beschränkung der glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus erst die notwendige Kinetik der Inhibition schaffen könnte, dann würden die beobachteten Unterschiede in der Verteilung Sinn ergeben. Für die Ratte wäre es demnach nicht notwendig, eine spezifische Anpassung der räumlichen Verteilung glycinerner Synapsen zu entwickeln, wogegen dies in der Wüstenrennmaus eine grundlegende Voraussetzung für die Funktion der MSO sein könnte. Interessanterweise zeigten sich beim Vergleich der generellen Ultrastruktur der MSO-Neurone beider Spezies auch keine auffälligen Unterschiede. Sowohl in der Wüstenrennmaus, wie auch in der Ratte, zeigten sich beispielsweise die präsynaptischen Spezialisierung der DPs, die möglicherweise der genauen Lenkung von synaptischen Vesikeln dienen und damit eine zuverlässige Transmitterausschüttung gewährleisten könnten (Akert 1972; Bloom & Aghajanian 1968; Pfenninger et al. 1972). Eine Funktion die auch für inhibitorische Synapsen von Bedeutung sein müsste, wie bereits für glycinerge Synapsen zu Mauthnerzellen im Goldfisch vorgeschlagen wurde (Sur et al. 1995; Triller & Korn 1982, 1985; Triller et al. 1997). Der einzige, aber wichtige, Unterschied zwischen beiden Spezies war die sowohl durch LM-Immunhistochemie als auch durch EM-Immunhistochemie festgestellte deutlich unterschiedliche Verteilung der glycinergen Synapsen. Während MSO-Neurone der Wüstenrennmaus eine signifikante Beschränkung der glycinergen Synapsen auf die Zellkörper und extrem proximalen Dendriten zeigten, war bei MSO-Neuronen der Ratte nahezu das Gegenteil zu beobachten, die Dichte der glycinergen Synapsen auf den Dendriten nahm sogar signifikant zu. Über die funktionalen Effekte einer solchen Anordnung der glycinergen Synapsen an Ratten-MSO-Neuronen kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden, da zu wenige *in vivo* wie auch *in vitro* elektrophysiologische Daten vorliegen, um das Verhalten der Ratten-MSO-Neurone bei

der Zeitverarbeitung zu beurteilen. Wenn zutrifft, dass die Verteilung der glycinergen Synapsen auf die Kinetik der Inhibition einen deutlichen Einfluss ausübt, dann könnte man allerdings erwarten, dass die Genauigkeit in der Zeitauflösung bei der Verarbeitung auditorischer Signale in der MSO der Ratte um eine Größenordnung unterhalb der in der MSO der Wüstenrennmaus beobachteten liegt. Dies kann aber nur durch weitere Experimente, beispielsweise durch *in vivo* Ableitungen in der Ratten-MSO und die Verwendung von SAM-Stimuli, geklärt werden.

Ein interessanter ethologischer Aspekt der homogenen Verteilung glycinerner Synapsen in der MSO der Ratte ist die Tatsache, dass eine solche Verteilung qualitativ auch an MSO-Neuronen ursprünglicher Säugetiere wie dem Opossum *Monodelphis domestica* (Rager 1999) und bei Spezialisten für hochfrequentes Hören wie der Schnurrbartfledermaus *Pteronotus parnellii* (Vater 1995) und der mexican free-tailed bat *Tadarida brasiliensis mexicana* (Kapfer 1999) festgestellt werden konnte. Besonders *Tadarida b.m.* scheint sich hier als Vergleich anzubieten, da die MSO dieser Art ebenfalls binaural erregende und hemmende Eingänge erhält (Grothe et al. 1994), wie sie auch die Wüstenrennmaus und die Ratte zeigen. Wie bei der Ratte, so konnte auch bei *Tadarida b.m.* physiologisch nur an ca. 55% der MSO-Neurone das Vorhandensein aller vier Eingänge nachgewiesen werden, bei den übrigen Zellen fehlten entweder der ipsilateral erregende Eingang oder erregende und hemmende Eingänge der ipsilateralen oder contralateralen Seite (Grothe et al. 1997). Die MSO-Neurone von *Tadarida b.m.* zeigen eine sehr gute Phasenkopplung zur Einhüllenden von SAM-Stimuli mit einer Tiefpassfilter-Charakteristik bis zu einer Modulationsfrequenz von ca. 600 Hz (Grothe et al. 1997) und eine hohe Sensitivität zu Einhüllenden-ITDs (Grothe & Park 1998). Die SAM-ITD-Funktionen der binauralen MSO-Neurone der Fledermaus *Tadarida b.m.* zeigen in ihrem Verhalten keine generellen Unterschiede zu den Reinton-ITD-Funktionen der MSO von Katzen (Yin & Chan 1990), Hunden (Goldberg & Brown 1969) und Wüstenrennmäusen (Brand et al. 2002). Wie bei diesen tieffrequent hörenden Tieren, so sind auch die ITD-Funktionen von *Tadarida b.m.*-MSO-Neuronen vom Spitzentyp, mit einer über alle getesteten Modulationsfrequenzen stabilen „besten ITD“ (Grothe & Park 1998). Sie verhalten sich damit wie die klassischen MSO-Koinzidenzdetektorneurone die in tieffrequent hörenden Säugern beschrieben wurden (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2000). Bedenkt man allerdings die nur sehr geringe Kopfbreite dieser Fledermäuse, welche maximal ITDs von ca. 50  $\mu$ s (Pollak 1988) erzeugen könnte, und zudem die Abstimmung ihres Hörsystems auf Frequenzen zwischen 10 kHz – 100 kHz (Schmidt et al. 1990), dann scheint diese ITD-Sensitivität im Zusammenhang mit Schalllokalisation im Azimut keine

Verhaltensrelevanz zu besitzen und eher ein Epiphänomen darzustellen. Dies wird klarer, wenn man sich vor Augen führt, dass nur ein Bruchteil des dynamischen Bereichs der ITD-Funktionen bei *Tadarida b.m.* im verhaltensrelevanten Bereich liegt, wogegen bei Wüstenrennmäusen ca. 80% (Brand et al. 2002) dieses Bereichs im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs liegen. Wie bereits bei Ratten angesprochen, so stehen auch Fledermäusen über den gesamten verhaltensrelevanten Frequenzbereich ausreichende ITDs zur Lokalisation einer Schallquelle in der horizontalen Ebene zur Verfügung. Die Funktion der MSO in Fledermäusen und eventuell auch in Ratten, sowie anderer nicht an die Wahrnehmung tiefer Frequenzen angepasster Säugetiere, scheint daher nicht primär im Kontext von Schalllokalisation im Azimut zu liegen, sondern scheint eher in einer generellen Analyse zeitlicher Muster im Schallsignal zu liegen (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2000).

Betrachtet man nun die notwendige Kinetik der Inhibition bei MSO-Neuronen von *Tadarida b.m.* bei der Analyse von SAM-Stimuli, so scheint diese im Bereich einiger weniger Millisekunden zu liegen, annähernd eine Größenordnung langsamer und damit unpräziser als in der MSO der Wüstenrennmaus (hunderte von  $\mu$ s). Wie Experimente von Grothe (1997) und Grothe et al. (1997) zeigen können, verschwindet die Tiefpassfilter-Charakteristik in der Phasenkopplung zur Einhüllenden von SAM-Stimuli bei *Tadarida b.m.*-MSO-Neuronen durch pharmakologische Blockade der glycinergen Inhibition *in vivo* mittels iontophoretischer Applikation von Strychnin. Die Modulationsgrenzfrequenz der Neurone, zu der noch eine Phasenkopplung möglich ist, verschiebt sich dadurch zu deutlich höheren Modulationsfrequenzen (Grothe 1997). Wenn man bedenkt, dass MNTB-Zellen bei *Tadarida b.m.* eine Phasenkopplung zu SAM-Stimuli bis zu Modulationsfrequenzen von über 1000 Hz zeigen können (Grothe & Park 1998; s.h. auch den Übersichtsartikel Grothe 2000), dann könnte die geringere Zeitauflösung der Inhibition der *Tadarida b.m.*-MSO-Neurone eventuell auf die homogene Anordnung der glycinergen Eingänge (Kapfer 1999) und damit unpräzisere inhibitorische Filter zurückzuführen sein. Eine solche Interpretation wird auch durch die Ergebnisse von Experimenten an MSO-Neuronen von *Tadarida b.m.* (Grothe et al. 1997) und der Wüstenrennmaus (Brand 2003) nahegelegt, die durch Stimulation mit frequenzmodulierten Signalen („FM-Sweep“), den Zeitraum untersuchten, in welchem eine contralateral getriebene Inhibition in der Lage ist, ein durch ipsilaterale Stimulation ausgelöstes Aktionspotential zu unterdrücken. In den besagten Experimenten wurde dazu der contralaterale Stimulus zeitlich konstant gehalten, während der ipsilaterale Stimulus von maximaler zu minimaler ITD (Zeitpunkt Null, beide Stimuli zeitgleich) verschoben wurde (Brand 2003; Grothe et al. 1997). Während die



dadurch ermittelte „Wirkzeit“ der contralateralen Inhibition in der MSO der Wüstenrennmaus ungefähr in einem Zeitraum von 500  $\mu$ s lag (Brand 2003), war dieser Zeitraum in der MSO von *Tadarida b.m.* mit ca. 1700  $\mu$ s (Grothe et al. 1997) mehr als drei mal so lang, oder anders formuliert, die Kinetik der Inhibition in der MSO der Wüstenrennmaus ist im Vergleich zu *Tadarida b.m.* ungefähr drei mal schneller. Dies könnte als weiteres Argument zugunsten der Hypothese einer Abhängigkeit zwischen der räumlichen Anordnung der glycinergen Eingänge und der Kinetik der Inhibition in der MSO angesehen werden. Wie es scheint, kann nur durch die spezifische Entwicklung einer räumlichen Begrenzung der glycinergen Eingänge die extrem gute Zeitauflösung der MNTB-Neurone erhalten und möglichst ohne zeitliches „Verschmieren“ auf die MSO-Neurone in der Wüstenrennmaus und anderer, auf die Wahrnehmung tiefer Frequenzen und die Analyse von ITDs angewiesener Säuger übertragen werden.

Eventuell stellen die MSO-Neurone der Ratte, der Fledermaus und des Opossums auch den evolutiv ursprünglichen Zustand der Säugetiere dar (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2000). Durch das Erschließen neuer Lebensräume und der Entwicklung größerer Köpfe entstanden dann sowohl neue Anforderungen wie Möglichkeiten (z.B. größerer Ohrabstand durch größere Köpfe), welche eine spezifische Anpassung des Hörsystems an die Wahrnehmung und Verarbeitung tieffrequenter Schalle erforderte. Neben Anpassungen der peripheren Strukturen des Hörsystems durch Spezialisierung der Cochlea und des Mittelohres, müssten in diesen Spezialisten für tieffrequentes Hören demnach auch spezifische Anpassungen in zentralen Strukturen des Hörsystems notwendig sein, um verhaltensrelevante Schalle auszuwerten. Die räumlich beschränkte Anordnung der glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen könnte nun eine solche spezifische Anpassung darstellen, welche es diesen Tieren ermöglicht die notwendige Kinetik der Inhibition zu erreichen um tiefe Frequenzen durch ITD-Analyse zu lokalisieren.

#### **5.2.4 Funktionelle Auswirkungen einer räumlich beschränkten Inhibition auf die ITD-Verarbeitung**

Wie in den vorangegangenen Kapiteln bereits mehrfach angesprochen und meist in einem vergleichenden Zusammenhang diskutiert, sollte es eine räumliche Beschränkung der glycinergen Synapsen ermöglichen, die im MNTB-Eingang vorliegende sehr hohe Zeitauflösung möglichst ohne Verluste an die MSO-Zelle weiterzugeben. Im Folgenden soll nun näher auf die tatsächliche Funktion der Inhibition bei der ITD-Verarbeitung und die mögliche Rolle der räumlichen Beschränkung der glycinergen Synapsen bei der Wüstenrennmaus eingegangen werden. Wie die Experimente von Brand et al. (2002) in der

MSO der Wüstenrennmaus nachweisen konnten, liegt der entscheidende Parameter zur Analyse von ITDs nicht im Punkt der „besten ITD“ sondern im steilsten Anstieg der ITD-Funktion, denn nur dieser Abschnitt der ITD-Funktion liegt im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs (120  $\mu$ s bei der Wüstenrennmaus), den das Tier aufgrund seiner Kopfgröße nutzen kann. Dieser Abschnitt stellt auch den Bereich der höchsten Dynamik und Sensitivität in der ITD-Funktion dar, da eine kleine Änderung im Raumwinkel zu einer relativ großen Änderung in der Feuerrate der Zelle führt (Skottun 1998; Skottun et al. 2001). Wurde in diesen Experimenten (Brand et al. 2002) nun die glycinerge Inhibition pharmakologisch durch iontophoretische Applikation von Strychnin *in vivo* blockiert, so erhöhte sich einerseits die Feuerrate der Zellen in einer ITD-spezifischen Art und Weise, andererseits verschoben sich die ITD-Funktionen aller untersuchten Zellen so, dass die maximale Steigung der ITD-Funktionen größtenteils außerhalb des verhaltensrelevanten Bereichs zu liegen kam (Brand et al. 2002). Damit reduzierte sich der zur ITD-Auswertung nutzbare dynamische Bereich um ca. 67% (Brand 2003). Die Funktion der Inhibition liegt nun darin, die basale, durch die phasengekoppelte Erregung definierte, ITD-Sensitivität so zu justieren, dass die maximale Steigung der Funktion bestmöglich im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs zu liegen kommt (Brand et al. 2002). Es scheint offensichtlich, dass die zeitliche Abstimmung der phasengekoppelten Inhibition sehr genau sein muss, da sie in einer spezifischen Phasenrelation zur Erregung an der Zelle eintreffen muss (Brand et al. 2002). Folglich muss die Inhibition die Zeitstruktur des Signals genau wiedergeben können (s.h. auch die Kapitel 2.2.3.2 und 2.2.3.3 der Einleitung). Da, wie bereits in Kapitel 5.2.1 erwähnt, MSO-Neurone in der Wüstenrennmaus sinusförmigen Reintönen bis zu 1800 Hz (Brand et al. 2002) oder 1900 Hz (Spitzer & Semple 1995) phasengekoppelt folgen können, sollte auch die Inhibition über eine exzellente Zeitauflösung verfügen. Bestätigt werden diese Annahmen durch ein, auf der Basis der elektrophysiologischen Daten entwickeltes, neuronales Modell zur Funktion der Inhibition bei der ITD-Verarbeitung in der MSO (Brand et al. 2002). Wie das Modell zeigen kann, ist eine contralateral führende, phasengekoppelte Inhibition (durch den MNTB) in der Lage die beobachtete Justierung der ITD-Funktionen zu erzeugen. Auf zellulärer Ebene könnte dabei ein von Grothe (2003, Übersichtsartikel) vorgeschlagenes Szenario vorliegen. Dabei würden die durch den ipsi- und contralateralen AVCN-Eingang vermittelten EPSPs ohne eine merkliche zeitliche Verzögerung in der MSO-Zelle eintreffen, wodurch die „beste ITD“ ohne Inhibition in etwa bei einer ITD von Null liegen sollte (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2003). Wenn nun die durch den MNTB-Eingang vermittelten IPSPs zeitlich etwas vor den vom contralateralen AVCN-Eingang vermittelten EPSPs in

der MSO-Zelle ausgelöst werden, dann würde das Amplitudenmaximum des sozusagen netto in der MSO-Zelle vorliegenden contra-EPSPs zeitlich um einige hundert  $\mu$ s verkürzt, es würde also zu einem etwas späteren Zeitpunkt und damit nicht bei einer ITD von Null sondern erst bei einer positiven ITD auftreten (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2003). Zusätzlich könnte eine ebenso phasengekoppelte, aber relativ zur ipsilateralen Erregung zeitlich leicht verzögerte, ipsilaterale Inhibition durch den LNTB zu einem verkürzten netto ipsi-EPSP führen (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2003). Dies könnte zu einer weiteren Verengung und Verschiebung des Integrationszeitfensters beitragen, in welchem eine Summation der contra-EPSPs und ipsi-EPSPs zu einem überschwelligem Aktionspotential möglich ist (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2003). Durch diese Interaktion von binauraler Erregung und Hemmung würde die maximale Feuerrate der MSO-Zellen nicht mehr, wie im Fall blockierter Inhibition, bei einer ITD von Null, sondern verschoben zu positiven ITDs im contralateralen Halbfeld auftreten. Damit einhergehend würde sich, wie unter Kontrollbedingungen von Brand et al. (2002) gemessen, der steilste Anstieg der ITD-Funktionen und damit ein Maximum des dynamischen Bereichs in den verhaltensrelevanten Bereich von ITDs verschieben. Damit die Inhibition diese Funktion ausüben kann, fordert das oben erwähnte Modell (Brand et al. 2002) eine extrem schnelle Kinetik der IPSCs im Bereich von wenigen hundert von  $\mu$ s (zur eingehenden Diskussion der synaptischen Eigenschaften von IPSPs / IPSCs siehe Kapitel 5.4.2).

Betrachtet man die präsynaptisch zur MSO gelegenen MNTB-Zellen, so scheinen diese, die durch das erwähnte Modell geforderten Voraussetzungen für einen schnellen und zeitlich präzisen inhibitorischen Eingang aufzuweisen. Die MNTB-Zellen erhalten durch GBCs aus dem contralateralen AVCN phasengekoppelte Eingänge (Smith & Rhode 1987; Smith et al. 1991). Diese Eingänge werden einerseits durch die sehr dicken, stark myelinisierten Axone der GBCs (4-12  $\mu$ m; Harrison & Warr 1962; Morest 1968a,b) und andererseits durch die Calyxsynapse (Held 1893) sehr schnell und sicher sowie zeitlich präzise auf die MNTB-Zelle übertragen (Taschenberger et al. 2002; s.h. auch den Übersichtsartikel von Gersdorff & Borst 2002). So zeigt die synaptische Übertragung zwischen Calyxsynapse und MNTB-Zelle eine äußerst niedrige zeitliche Variabilität (Guinan & Li 1990; Taschenberger & von Gersdorff 2000) mit extrem kurzen synaptischen Verzögerungen, die nur im Bereich von ca. 200  $\mu$ s liegen (Taschenberger & von Gersdorff 2000). Es ist daher nicht verwunderlich, dass auch die MNTB-Zellen *in vivo* eine präzise Phasenkopplung zu tieffrequenten Reintönen bis zu ca. 1500 Hz zeigen (Paolini et al. 2001; Smith et al. 1998). Die spezifischen Anpassungen an eine schnelle und präzise

synaptische Übertragung könnte es der contralateralen Inhibition auch ermöglichen die MSO-Zelle vor der contralateralen Erregung zu erreichen. Tatsächlich konnte in der Schnurrbartfledermaus festgestellt werden, dass in einer nicht unerheblichen Anzahl an MSO-Zellen die contralaterale MNTB-Inhibition vor der contralateralen Erregung, oder zumindest gleichzeitig zu ihr, ankam (Grothe 1994). Da, wie bereits in Kapitel 5.2.3 erwähnt, die glycinergen Projektionen zu MSO-Neuronen der Schnurrbartfledermaus im Gegensatz zur Wüstenrennmaus keine räumliche Beschränkung auf die Somaregion aufweisen (Vater 1995), scheint eine spezifische räumliche Anordnung der Synapsen, jedenfalls für die MNTB – MSO – Projektion, möglicherweise keinen nennenswerten Einfluss auf die Ankunftszeit der Inhibition zu haben. Es scheint daher wahrscheinlicher, dass diese Eigenschaft des contralateralen inhibitorischen Eingangs zum Großteil in der Anatomie und Physiologie der AVCN – MNTB – Projektion begründet liegt.

Wenn man die Eigenschaften der MNTB-Zellen betrachtet, scheint klar zu sein, dass ein möglicher limitierender Faktor in der Kinetik der inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen nicht in der AVCN – MNTB – Projektion und nicht im Verhalten der MNTB-Zellen selbst liegen dürfte. Damit bliebe als kritischer Punkt der contralateralen AVCN – MNTB – MSO – Achse der letzte Abschnitt, also die Verbindung der MNTB-Axone zur MSO-Zelle. Dabei könnte der räumlichen Verteilung dieser Eingänge wiederum entscheidende Bedeutung zukommen. Für erregende Synapsen ist seit langem etabliert, dass neben spannungsaktivierten Leitfähigkeiten unter anderem die elektrotonische Position entlang der Zelle erhebliche Auswirkungen auf die zeitliche und räumliche Integration der synaptischen Potentiale und Ströme ausübt (Jack & Redman 1971; Rall 1967; s.h. auch den Übersichtsartikel Reyes 2001). So werden durch die passiven Kabeleigenschaften der Dendriten und durch transmembrane Leckströme Filter geschaffen, welche die Amplitude abschwächen und den Zeitverlauf der EPSPs verbreitern können (Rall 1967; Stuart & Spruston 1998). Damit wird der Zeitverlauf eines singulären dendritischen EPSPs im Vergleich zu einem somatischen EPSP verlangsamt und die Trennung einzelner, zeitlich leicht versetzt zueinander auftretender, synaptischer Ereignisse kann nicht mehr stattfinden. Es kommt also durch Dendriten im wesentlichen zu einer linearen Summe mehrerer synaptischer Ereignisse über einen gewissen Zeitraum (Reyes & Sakmann 1996), was damit zu einer „Verschmierung“ der zeitlichen Eigenschaften des einzelnen Ereignisses führen sollte. Diese dendritischen Eigenschaften können für die Integration über eine große Anzahl an Eingängen förderlich sein, um im Fall der Erregung beispielsweise die Aktionspotentialschwelle zu überschreiten (s.h. den Übersichtsartikel Reyes 2001), gehen aber zu Lasten der Trennung und Abstimmung

zeitlich distinkter synaptischer Ereignisse. Obwohl für inhibitorische Synapsen nur sehr wenige Informationen zum physiologischen Einfluss der elektrotonischen Position an Neuronen vorliegen, ist es doch wahrscheinlich, dass auch die IPSPs / IPSCs denselben, allgemeinen Regeln wie EPSPs / EPSCs unterliegen (s.h. Williams & Stuart 2003; Xiang et al. 2002). Wenn man nun annimmt, dass die passiven Kabeleigenschaften der Dendriten weitgehend unabhängig von der Natur des Potentials oder Stroms sind, dann müssten die inhibitorischen synaptischen Ereignisse in gleicher Weise einer zeitlichen Filterung unterliegen (Larkman et al. 1992; s.h. auch den Übersichtsartikel Spruston et al. 1994). Eine solche Verschlechterung zeitlicher Präzision zugunsten einer besseren Integration von Potentialen und Strömen scheint aber genau im Widerspruch zur notwendigen Kinetik der Inhibition in der ITD-Verarbeitung zu stehen. Denn gerade die präzise zeitliche Abstimmung von Erregung und Hemmung scheint doch die grundlegende Voraussetzung zur Etablierung der ITD-Sensitivität in der MSO darzustellen. Die anatomisch festgestellte räumliche Beschränkung der glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus könnte daher vom Standpunkt der elektrotonischen Synapsenposition eventuell die einzige Lösung darstellen möglichst wenig dendritische Filterung zuzulassen und damit die Zeitstruktur des Eingangssignals postsynaptisch möglichst genau zu erhalten. Die räumliche Beschränkung inhibitorischer Synapsen könnte daher in ITD-nutzenden Säugetieren die entscheidende zelluläre Anpassung an eine zeitlich präzise Verarbeitung darstellen, wodurch sich die oben genannten Effekte von räumlicher und zeitlicher Summation auf ein Mindestmaß beschränken ließen. Eine Hypothese, die bereits von Clark (1969a) aus den Ergebnissen seiner Untersuchung der Katzen-MSO (s.h. Kapitel 5.2.2) abgeleitet wurde. Es fehlen allerdings bis jetzt direkte physiologische Nachweise, welche diese Hypothese stützen oder zurückweisen würden. Möglicherweise könnten zukünftige *in vitro* Arbeiten mit direkten dendritischen Ableitungen an MSO-Neuronen von Wüstenrennmäusen (räumliche Beschränkung) und Ratten (keine räumliche Beschränkung) mit adultem Hörsystem zur Klärung dieser Frage beitragen.

Eine indirekte Bestätigung des Zusammenhangs zwischen der räumlich begrenzten Verteilung der glycinergen Eingänge an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus und der Funktion der Inhibition in der ITD-Verarbeitung kommt von physiologischen *in vivo* Untersuchungen im DNLL der Wüstenrennmaus (Seidl & Grothe 2003) und von einem weiteren neuronalen MSO-Modell (Leibold 2002). Der DNLL, ein Kerngebiet des auditorischen Stammhirns, erhält neben direkten Eingängen aus der ipsi- und contralateralen LSO auch eine beachtliche Anzahl direkter erregender Projektionen aus der ipsilateralen MSO (Glendenning et al. 1981; Henkel 1997; Kollmar 2003; Shneiderman et

al. 1988). In seiner Funktion wird der DNLL eher nicht mit einer anspruchsvollen Integration und Weiterverarbeitung der erwähnten Eingänge in Verbindung gebracht, sondern er wird mehr als eine Art Relais betrachtet, welches durch erregende Eingänge aus dem SOC vermittelte Information in eine GABAerge Hemmung zu Neuronen des ICs umwandelt (Adams & Mugnaini 1984; Gonzalez-Hernandez et al. 1996; Zhang et al. 1998a). Aufgrund dieser Eigenschaften wird angenommen, dass die tieffrequenten DNLL-Neurone in ihrem Antwortverhalten den MSO-Eingang und damit das Antwortverhalten der MSO-Neurone widerspiegeln (Kuwada et al. 1997). Tatsächlich zeigen auch die von Seidl & Grothe (2003) in der adulten Wüstenrennmaus untersuchten DNLL-Neurone eine zu MSO-Neuronen nahezu identische ITD-Sensitivität. Auch die ITD-Funktionen der DNLL-Neurone zeigten ihre maximale Antwort, also ihre „beste ITD“, außerhalb des verhaltensrelevanten Bereichs von ITDs, während der steilste Anstieg der Funktionen und damit ein Maximum des dynamischen Bereichs der Kurven nahe einer ITD von Null innerhalb des verhaltensrelevanten Bereichs von ITDs platziert war (Seidl & Grothe 2003). Im Gegensatz dazu zeigte sich in DNLL-Neuronen junger Tiere (P15 – P16) eine deutlich veränderte ITD-Sensitivität, wobei die Funktionen ihre „beste ITD“ nahe einer ITD von Null aufwiesen und der größte Teil des dynamischen Bereichs der Funktionen außerhalb des verhaltensrelevanten Bereichs platziert war (Seidl & Grothe 2003). Die ITD-Sensitivität zeigt damit eine analoge Verschiebung der Funktionen, wie sie von Brand et al. (2002) während der pharmakologischen Blockade der glycinergen Inhibition beobachtet werden konnte. Im Unterschied zur pharmakologischen Blockade der Inhibition in der MSO kann die veränderte ITD-Sensitivität im DNLL junger Tiere allerdings nicht auf eine unwirksame Inhibition zurückgeführt werden, da die glycinerge Inhibition im Stammhirn und damit auch in der MSO in dieser Altersstufe bereits voll funktionsfähig ist und inhibitorisch wirkt (diese Arbeit s.h. Kapitel 4.4; Kandler & Friauf 1995b; Sanes 1993). Es ist vielmehr höchstwahrscheinlich, dass die unterschiedliche ITD-Sensitivität in DNLL-Neuronen adulter und junger Tiere durch Unterschiede in der räumlichen Verteilung der glycinergen Synapsen an den MSO-Neuronen bedingt wird. Wie in den Ergebnissen dieser Arbeit dargestellt, verteilten sich die glycinergen Synapsen bei Wüstenrennmäusen vor Hörbeginn (P10) homogen über die Somata und gesamten Dendriten, die räumliche Beschränkung hatte sich also in diesen Tieren noch nicht entwickelt (zur Diskussion der Entwicklung s.h. Kapitel 5.3). Eine weitere immunhistochemische Untersuchung zum zeitlichen Verlauf dieser Entwicklung nach Hörbeginn (Ehrhardt 2000) legt zudem den Schluss nahe, dass eine räumliche Beschränkung der glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus qualitativ frühestens am Postnataltag 17 erkennbar ist

und eventuell am Postnataltag 19 weitgehend abgeschlossen sein könnte (Ehrhardt 2000). In den Altersstufen, welche in der DNLL-Studie von Seidl & Grothe (2003) auf ihre ITD-Sensitivität hin untersucht wurden (P15 – P16), zeigten nahezu alle MSO-Neurone immunhistochemisch eine homogene Verteilung der glycinergen Eingänge über Somata und gesamte Dendriten (Ehrhardt 2000). Es besteht also eine auffällige Korrelation zwischen der homogenen Verteilung der glycinergen Synapsen in der MSO und der veränderten ITD-Sensitivität der DNLL-Neurone in der Wüstenrennmaus. Wenn man davon ausgeht, dass sich der MSO-Eingang im Antwortmuster der DNLL-Neurone nahezu identisch widerspiegelt, dann müsste es eben die ITD-Sensitivität der MSO-Neurone von P15 – P16 Tieren sein, welche durch die homogene Verteilung der inhibitorischen Eingänge massiv verändert wurde. Bestätigung findet der direkte Zusammenhang zwischen der räumlichen Verteilung der glycinergen Synapsen und der ITD-Sensitivität in der MSO durch weitere *in vivo* Ableitungen von DNLL-Neuronen in adulten Wüstenrennmäusen, deren auditorische Erfahrung während der Entwicklung (von P10 – P25) durch Aufzucht in omnidirektionalem, weißem Rauschen manipuliert wurde (NRA-Tiere; Seidl & Grothe 2003; s.h. auch Kapitel 5.3). Die Manipulation der auditorischen Erfahrung verhinderte bei diesen Tieren die Entwicklung der räumlichen Beschränkung glycinерger Synapsen zu MSO-Neuronen, im Gegensatz zu normalen adulten Wüstenrennmäusen verteilten sich die inhibitorischen Eingänge bei NRA-Tieren eher gleichmäßig über Somata und Dendriten (Kapfer et al. 2002; Seidl & Grothe 2003). Tatsächlich zeigen auch die DNLL-Neurone adulter NRA-Tiere physiologisch nicht die ITD-Sensitivität welche DNLL- (Seidl & Grothe 2003) und MSO-Neurone (Brand et al. 2002) normal adulter Wüstenrennmäuse aufweisen. Wie schon in DNLL-Neuronen junger Tiere, sind die ITD-Funktionen von NRA-Tieren mit ihrer „besten ITD“ zu Null verschoben, womit der größte Teil des dynamischen Bereichs der Funktionen auch hier außerhalb des verhaltensrelevanten Bereichs von ITDs zu liegen kommt (Seidl & Grothe 2003). Diese Ergebnisse können auch durch ein neuronales Modell zur Entwicklung der glycinergen Eingänge und der ITD-Verarbeitung in der MSO simuliert werden (Leibold 2002). Nach diesem Modell kann die physiologisch beobachtete ITD-Sensitivität in der MSO der adulten Wüstenrennmaus nur erreicht werden, wenn die glycinergen Synapsen an den modellierten Hodgekin-Huxley Neuronen in der Somaregion platziert werden. Liegen sie dagegen auch an den Dendriten vor, so verschieben sich die ITD-Funktionen in derselben Weise, wie es experimentell in DNLL-Neuronen von jungen und NRA-Tieren beobachtet wurde (Leibold 2002). Aus den eben diskutierten Ergebnissen könnte man daher folgern, dass eine direkte Abhängigkeit zwischen der räumlichen Anordnung der glycinergen

Synapsen an MSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus und der Zeitauflösung bei der ITD-Verarbeitung herrscht. Wie es scheint, kann die beobachtete ITD-Sensitivität der adulten MSO-Neurone nur durch eine räumliche Beschränkung der glycinergen Synapsen auf die Somaregion erreicht werden. Sie scheint daher ein integraler Bestandteil zur Etablierung der notwendigen, zeitlich genau mit der Erregung abgestimmten Aktivität der inhibitorischen Eingänge zu sein.

Direkte Evidenzen, dass eine räumlich auf die Zellkörper beschränkte Anordnung inhibitorischer Synapsen eine dendritische Filterung von IPSPs / IPSCs verhindern und damit die zeitliche Auflösung bei der Integration von EPSPs / EPSCs verbessern könnte, kommen von *in vitro* Untersuchungen an hippocampalen (Buhl et al. 1994; Miles et al. 1996; Pouille & Scanziani 2001) und corticalen Pyramidenzellen (Larkman et al. 1992; Williams & Stuart 2003; Xiang et al. 2002). Diese Untersuchungen an Pyramidenzellen können dabei mittels dendritischer und somatischer Ableitungen eine Abhängigkeit der IPSP / IPSC-Kinetik von der Lage der inhibitorischen Synapsen nachweisen. Alle Studien in diesen Systemen stimmen darin überein, dass eine somatische Lokalisierung der inhibitorischen Synapsen zur Erhaltung zeitlich schneller Zeitkonstanten der IPSPs / IPSCs im Prinzip von Vorteil ist. Allerdings zeigen vorallem die corticalen Studien z.T. widersprüchliche Ergebnisse in Bezug auf die Frage, ob eine dendritische Lokalisierung der Synapsen generell die Kinetik der Potentiale und Ströme verlangsamt. Während die passiven Filtereigenschaften der Dendriten an hippocampalen Pyramidenzellen eindeutig zu langsameren Zeitkonstanten der IPSPs / IPSCs dendritischer Synapsen am Soma führen (Buhl et al. 1994; Miles et al. 1996; Pouille & Scanziani 2001), scheint die Kinetik der dendritischen IPSPs / IPSCs corticaler Pyramidenzellen durch weitere Faktoren beeinflusst zu werden. Zu diesen Faktoren zählen unter anderem aktive dendritische Leitfähigkeiten (Williams & Stuart 2003) und verschiedene Unterklassen von Interneuronen, die spezifische Bereiche der apikalen Dendriten innervieren (Xiang et al. 2002). Es ist daher in den untersuchten Schicht-V-Pyramidenzellen des Neocortex möglich, dass dendritische Potentiale und Ströme nicht generell langsamer sein müssen als somatische. Speziell das Membranpotential der Zellen und die Aktivierung von spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten scheinen dabei eine dominante Rolle zu spielen (Williams & Stuart 2003). Es bleibt allerdings fraglich, ob diese dendritischen Eigenschaften der corticalen Pyramidenzellen von genereller Relevanz für andere Systeme sind, da sie beispielsweise im Hippocampus nicht beobachtet werden können (Buhl et al. 1994; Miles et al. 1996; Pouille & Scanziani 2001). Es scheint daher sinnvoller einen genaueren Blick auf die Unterschiede zwischen dendritischer und somatischer Inhibition in hippocampalen



Pyramidenzellen zu werfen. Besonders die Arbeit von Pouille & Scanziani (2001) scheint in diesem Zusammenhang von Interesse sein, da sie eine spezifische funktionelle Rolle somatischer Inhibition bei der Koinzidenzdetektion erregender Eingänge auf zellulärer Ebene vorschlagen. In ihrer Studie können Pouille & Scanziani (2001) durch kombinierte somatische und dendritische Ableitungen an Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus nachweisen, wie eine somatische oder Soma-nahe Inhibition das Integrationszeitfenster bei der Koinzidenzdetektion erregender Eingänge signifikant verschärfen kann. Die durch Schaffercollaterale, via GABAerger Interneurone, vermittelte Inhibition ist dabei in der Lage das Integrationszeitfenster zur Koinzidenzdetektion von ebenfalls Schaffercollateral-vermittelten, erregenden Eingängen von ca. 18 ms auf ca. 2 ms zu begrenzen (Pouille & Scanziani 2001). Dies ist allerdings nur möglich, wenn eine bestimmte Subpopulation von Interneuronen, welche spezifisch am oder nahe zum Soma der CA1-Pyramidenzellen Synapsen bilden, aktiviert wird. Eine an den apikalen Dendriten lokalisierte Inhibition ist dagegen nicht in der Lage dieses Integrationszeitfenster zu verschärfen (Pouille & Scanziani 2001). Auch wenn diese Untersuchung zeigen kann, dass eventuell nur eine somatische Inhibition zu einer zeitlichen Verschärfung in der Koinzidenzdetektion beitragen kann, so ist doch fraglich, ob der an CA1-Pyramidenzellen vorliegende Mechanismus auf MSO-Neurone übertragbar ist. So muss die notwendige Kinetik bei der ITD-Verarbeitung in der MSO im  $\mu$ s-Bereich liegen und damit eine Größenordnung besser sein als im Hippocampus. Andererseits muss die Inhibition an der CA1-Pyramidenzelle, im Gegensatz zur MSO, mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung in Relation zur Erregung eintreffen, um das Integrationszeitfenster zu definieren (Pouille & Scanziani 2001). Wird nun in diesen Pyramidenzellen eine somatische Inhibition aktiviert, so trifft diese mit eben jener Verzögerung von ca. 2 ms an der Zelle ein, d.h. nur vorher ankommende EPSPs/EPSCs können sich zu einem Aktionspotential summieren, später ankommende EPSPs/EPSCs können durch die inhibitionsaktivierte Hyperpolarisation nicht mehr bis zur Aktionspotentialschwelle summieren (Pouille & Scanziani 2001). Wird nun eine dendritische Inhibition aktiviert, so trifft diese durch die dendritische Filterung zum einen abgeschwächt und zum anderen später am Soma ein. Damit wird der Erregung die Möglichkeit eröffnet über einen längeren Zeitraum zu summieren. Wie bereits diskutiert, scheint allerdings in der MSO, im Gegensatz zum Hippocampus, die präzise relative zeitliche Abstimmung der Erregung und Hemmung innerhalb eines Zyklus der sinoidalen Schallwelle entscheidend für die beobachtete ITD-Sensitivität zu sein (s.h. den Übersichtsartikel Grothe 2003). Wie die neuronalen Modelle (Brand et al. 2002; Leibold 2002) vorhersagen, lässt sich nur durch eine solche Interaktion

von Erregung und Hemmung die spezifische Form der ITD-Funktion, mit der maximalen Steigung nahe einer ITD von Null, bei adulten Wüstenrennmäusen erklären. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass sich der hippocampale Mechanismus der Koinzidenzdetektion auf die Koinzidenzdetektion und ITD-Verarbeitung in der MSO übertragen lässt.

Ein weiterer interessanter, wenn auch hypothetischer, Aspekt des Effekts der elektrotonischen Position der glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen könnte im oben erwähnten Modellvorschlag einer in Relation zur ipsilateralen Erregung leicht verzögert ankommenden ipsilateralen Hemmung liegen. Eine solche Verzögerung ließe sich natürlich durch etliche Möglichkeiten erzeugen, wobei zwei Möglichkeiten als wahrscheinlich gelten können. So könnte diese Verzögerung, analog zur zeitlichen Führung der contralateralen Hemmung, schon in der AVCN – LNTB – Projektion angelegt sein, da beispielsweise das Axon einer GBC an der LNTB-Zelle nicht eine große Calyxsynapse sondern mehrere kleinere, calyxartige Synapsen bildet. Eventuell erreicht die zeitliche Übertragung an diesen Synapsen nicht diegleiche Präzision wie an der Calyxsynapse im MNTB, wodurch eine leichte zeitliche Verzögerung und Ungenauigkeit der Übertragung stattfinden könnte. Da allerdings zur *in vitro* Physiologie der LNTB-Zellen keine nennenswerten Untersuchungen vorliegen, bleibt unklar, ob diese Möglichkeit zutreffen könnte. Andererseits könnte diese geringe Verzögerung möglicherweise auch durch eine mehr distal am Dendriten gelegene Position der Synapsen erreicht werden. Wie in Kapitel 5.2.2 dargestellt, wurde in der MSO des Chinchillas ein dritter, wahrscheinlich inhibitorischer Synapsentyp klassifiziert, der im Gegensatz zu Gray-Typ-2 Synapsen nicht ausschließlich am Soma sondern eher an den Dendriten zu finden ist (Perkins 1973). Dieser Synapsentyp repräsentiert ca. 15% der dendritischen Synapsen (Perkins 1973), eine Zahl die ungefähr mit der in der vorliegenden Arbeit lichtmikroskopisch quantifizierten Restanzahl (7 – 17% s.h. Quantifizierung in Kapitel 4.1.4) glycinерger Synapsen an distalen Dendriten in der MSO der Wüstenrennmaus zusammenfällt. Man könnte daher spekulieren, ob diese Synapsen möglicherweise den gesamten oder einen Teil des LNTB-Eingangs darstellen könnten. Zudem scheint der LNTB-Eingang zur MSO sowohl anatomisch wie physiologisch im allgemeinen schwächer als der MNTB-Eingang zu sein (Cant & Hyson 1992, Grothe & Sanes 1993; Kuwabara & Zook 1992). Dieses Verhalten könnte sich ebenfalls, zumindest teilweise, durch die möglicherweise dendritische Lokalisierung einer eher geringen Anzahl an Synapsen erklären lassen. Diese Hypothesen sind aber, wie gesagt, rein spekulativ und können erst durch weitere *in vivo* und *in vitro* Experimente geklärt werden, die sich speziell mit der Anatomie und Physiologie der

LNTB – MSO – Projektion befassen.

### **5.3 Entwicklung der räumlichen Beschränkung glycinerger Eingänge zu MSO-Neuronen**

#### **5.3.1 Erfahrungsabhängigkeit der Entwicklung**

Wie die Ergebnisse zeigen, verteilten sich die glycinergen Synapsen bei MSO-Neuronen junger Wüstenrennmäuse und junger Ratten ohne Hörerfahrung (jung, P10) homogen über die Somata und gesamten Dendriten. Nachdem die Cochlea am Postnataltag 12 ihre Funktionsfähigkeit erreicht hat (Finck et al. 1972; Woolf & Ryan 1984, 1985) und die Tiere Luftschall wahrnehmen können, kommt es in Wüstenrennmäusen, nicht aber in Ratten zu einer signifikanten Umgestaltung der räumlichen Verteilung der glycinergen Eingänge, welche in Wüstenrennmäusen mit vollentwickeltem Hörsystem (adult) zu einer räumlichen Beschränkung der glycinergen Eingänge auf die Somata und extrem proximalen Dendriten führte. Durch eine einseitige Cochleaentnahme vor Hörbeginn (UCA) wurde diese Entwicklung verhindert und die inhibitorischen Eingänge verteilten sich in adulten UCA-Wüstenrennmäusen analog zu jungen Wüstenrennmäusen und jungen sowie adulten Ratten homogen über die gesamten Zellen.

Die quantifizierten Unterschiede in der räumlichen Verteilung der Bestandteile des Glycinrezeptorkomplexes zwischen jungen und adulten Wüstenrennmäusen einerseits und adulten Wüstenrennmäusen und adulten Ratten andererseits, weisen dabei auf eine selektive Entfernung von Synapsen an den Dendriten bei adulten Wüstenrennmäusen hin. Allerdings müssten diese Unterschiede in der räumlichen Verteilung nicht zwangsläufig durch eine selektive Entfernung von Synapsen an den Dendriten bei adulten Wüstenrennmäusen verursacht sein. Rein theoretisch bieten sich auch alternative Erklärungsmöglichkeiten an, welche eventuell durch die Methoden der Quantifizierung nicht erkennbar wären. Durch die Normalisierung der dendritischen Dichtewerte auf die Anzahl markierter Boutons oder Cluster pro  $\mu\text{m}$  Membran am Soma, wäre es beispielsweise möglich, dass die beschriebene Abnahme der Synapsendichte an Dendriten adulter Wüstenrennmaus MSO-Neurone durch eine deutliche Proliferation glycinerger Synapsen an den Somata, bei einer gleichzeitig konstanten Anzahl an Synapsen auf den Dendriten gleichsam künstlich entsteht. Genauso könnte bei Ratten die hohe Dichte inhibitorischer Synapsen an den Dendriten durch eine sehr niedrige Anzahl somatischer Synapsen künstlich erzeugt werden. Weiter könnten die Unterschiede in der Synapsendichte auf den Dendriten auch durch eine Veränderung in der Anzahl

dendritischer Verzweigungen entstehen. Eine Zu- oder Abnahme der dendritischen Fläche und damit einhergehend der Anzahl an Synapsen während der Entwicklung oder bedingt durch die einseitige Cochleaentnahme könnte daher möglicherweise ebenfalls das Ergebnis der Quantifizierungen beeinflusst haben. Diese vordergründig möglichen Unsicherheiten in der Aussagekraft der Quantifizierungen sind aber aus mehreren Gründen mit hoher Sicherheit auszuschließen. So wurde beispielsweise die Dichte von glycinergen Boutons und Glycinrezeptoren bei Wüstenrennmäusen pro  $\mu\text{m}$  Zellmembran an individuellen Neuronen bestimmt. Selbst wenn nun Veränderungen der dendritischen Fläche stattfanden, würden sie durch diese Art der Analyse keinen Effekt auf die Ergebnisse der Verteilung in den einzelnen Gruppen haben. Da zudem auch die unabhängig von individuellen Neuronen erhobene Dichteverteilung pro Fläche für glycinerge Boutons und Glycinrezeptoren identische Ergebnisse zeigte, scheint es eher unwahrscheinlich, dass überhaupt signifikante Veränderungen in der Verzweigung der Dendriten zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen von Wüstenrennmäusen auftreten. Was eine mögliche Unsicherheit durch die Normalisierung der Daten zum Wert am Soma bei adulten Wüstenrennmäusen betrifft, so zeigte der Vergleich der absoluten Zahl glycinерger Boutons pro  $\mu\text{m}$  Somamembran keine Unterschiede zwischen jungen und adulten Wüstenrennmäusen und damit auch keine Anzeichen für eine somatische Proliferation von Synapsen bei adulten Tieren. In gleicher Weise zeigten sich zwischen adulten Wüstenrennmäusen und Ratten keine Unterschiede in der absoluten Zahl glycinерger Boutons pro  $\mu\text{m}$  Somamembran. Daher sind die deutlichen Unterschiede in der dendritischen Verteilung glycinерger Synapsen zwischen beiden Arten nicht auf unterschiedliche Synapsenverteilungen an den Zellkörpern zurückzuführen. Da auch in der absoluten somatischen Dichte von postsynaptischen Gephyrinclustern zwischen jungen und adulten Ratten keine Unterschiede feststellbar waren, könnte man annehmen, dass die Anzahl glycinерger Synapsen an den Zellkörpern generell eher konstant bleibt, während die an Dendriten lokalisierten Synapsen eher möglichen Entwicklungsprozessen unterworfen sind. Aus den eben diskutierten Punkten zur Signifikanz der Quantifizierungen lässt sich somit ableiten, dass weder eine Proliferation von glycinерgen Synapsen am Soma, noch eine Veränderung der Dendritenbäume von MSO-Neuronen der beobachteten Entwicklung einer räumlichen Beschränkung der glycinерgen Synapsen an MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus zugrundeliegen können. Es kann daher zwingend gefolgert werden, dass die während der Entwicklung zwischen jungen und adulten Wüstenrennmäusen beobachtete Veränderung in der räumlichen Anordnung glycinерger Synapsen durch eine selektive Eliminierung dendritischer Synapsen zustande

kommt.

Wie aus den präsentierten Ergebnissen hervorgeht, werden die glycinergen Eingänge zu MSO-Neuronen sowohl in der Wüstenrennmaus als auch in der Ratte ohne luftschallinduzierte Aktivität der Cochlea, durch embryonale oder frühe postnatale Entwicklungsprozesse, in einer diffusen Verteilung über die gesamte Ausdehnung der Zellen angelegt. Diese diffus verteilten Synapsen sind dabei am Postnataltag 10, zwei Tage vor Hörbeginn, sowohl anatomisch wie physiologisch bereits als funktionelle Synapsen erkennbar. Wie die EM-Untersuchung der P10-MSO-Neurone von Wüstenrennmäusen und Ratten zeigte, waren die prä- und postsynaptischen Elemente in der ultrastrukturellen Anatomie in typischer Weise angelegt und es konnten keine gravierenden Unterschiede zu adulten Tieren festgestellt werden. Physiologische *in vitro* Untersuchungen konnten in der LSO (Kandler & Friauf 1995b) und MSO (Smith et al. 2000) der Ratte und der LSO (Sanes 1993) und MSO (Rowland & Spirou 2001, 2002) der Wüstenrennmaus nachweisen, dass die glycinergen Synapsen durch Stimulation der MNTB-Axone aktiviert werden können und in einer Hyperpolarisation der MSO- oder LSO-Zellen resultieren. Es ist daher anzunehmen, dass die glycinergen Synapsen im SOC am Postnataltag 10 bereits funktionell inhibitorisch sind. Die initial diffuse Verteilung der glycinergen Synapsen in dieser Altersstufe dürfte daher den Grundzustand des Systems darstellen, der sich ohne Hörerfahrung und wahrscheinlich nur unter dem Einfluss unkorrelierter Spontanaktivität der Cochlea entwickelt (Kotak & Sanes 1996). Im Gegensatz zu dieser frühen postnatalen Entwicklung im Projektionsmuster der inhibitorischen Eingänge zu MSO-Neuronen, deuten die Ergebnisse dieser Arbeit in der Wüstenrennmaus eine spezifische Abhängigkeit zwischen der räumlichen Differenzierung glycinerger Eingänge nach Hörbeginn und der sensorischen Wahrnehmung akustischer Stimuli an. Wobei bereits der Unterschied zwischen Wüstenrennmäusen und Ratten in der Entwicklung der glycinergen Eingänge nach Hörbeginn ein erstes Indiz dafür sein könnte, dass möglicherweise eine bloße luftschallgetriebene Aktivierung der Eingänge nicht ausreicht, um diese Entwicklung zu steuern. Es scheint daher plausibler die beobachtete Entwicklung in Wüstenrennmäusen auf einen spezifischen, aktivitäts- oder erfahrungsabhängigen Prozess zurückzuführen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die präsentierten Daten aus den UCA-Wüstenrennmäusen. Wie die Ergebnisse zeigen, kann sich in diesen monaural aufwachsenden Tieren die normale adulte Verteilung der glycinergen Eingänge nicht entwickeln. Das einseitige Entfernen der Cochlea vor Hörbeginn resultiert dabei in einer signifikanten anatomischen Umgestaltung des Projektionsmusters der erregenden und hemmenden Eingänge zu den MSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus (Kitzes et al. 1995;

Russell & Moore 1995). So erhalten sowohl ipsilateral, als auch contralateral zur entfernten Cochlea gelegene MSO-Neurone nur noch einen monaural erregenden Eingang aus dem contralateral zur Vertäubung liegenden AVCN. Dieser monaural erregende Eingang projiziert dabei auch nicht nur auf die lateralen, respektive medialen Dendriten der MSO-Neurone sondern durch ectopische Projektionen, welche das Zellband kreuzen, innerviert er nun beide Dendriten zu gleichen Teilen (Kitzes et al. 1995; Russell & Moore 1995). Auch für die inhibitorischen Eingänge ergeben sich weitreichende Konsequenzen aus der einseitigen Vertäubung. Wie die Arbeiten von Kitzes et al. (1995) und Russell & Moore (1995) zeigen können, wird durch die einseitige Cochleaentnahme das Einwandern von ectopischen Fasern aus dem AVCN der intakten Seite zum contralateral zur Vertäubung gelegenen MNTB induziert. Durch diese ectopische Projektion werden damit beide MNTBs, sowohl ipsilateral als auch contralateral zur Vertäubung, von denselben GBCs ergo demselben Ohr innerviert. Physiologisch zeigen diese, durch ectopische Projektionen innervierten MNTB-Neurone dabei in adulten Wüstenrennmäusen ein zu normal innervierten MNTB-Zellen vergleichbares Antwortverhalten (Kitzes et al. 1995). Wie für die Erregung, so resultiert die einseitige Cochleaentnahme also auch für die Inhibition in einer Monauralisierung der Eingänge zu MSO-Neuronen. Wenn nun die bloße Aktivität der erregenden und hemmenden Eingänge der Entwicklung räumlich beschränkter glycinерger Projektionen zugrundeliegen sollte, dann könnte man erwarten, diese auch in einem monauralisierten System vorzufinden. Speziell contralateral zur Vertäubung gelegene MSO-Neurone müssten dann eine räumliche Differenzierung der inhibitorischen Synapsen zeigen. Denn diese Zellen erhalten sowohl MNTB- als auch LNTB-Eingänge, wogegen ipsilateral gelegene MSO-Neurone nur den MNTB-Eingang erhalten. Da sie prinzipiell von den gleichen Neurontypen des AVCNs und des MNTBs sowie LNTBs innerviert werden, müssten der erregende und die hemmenden Eingänge zu UCA-MSO-Neuronen, trotz ihrer Monauralität, analog zu intakten Tieren eine Phasenkopplung zu tieffrequenten Reintönen zeigen. Es dürfte daher wahrscheinlich sein, dass auch die UCA-MSO-Neurone selbst ein phasengekoppeltes Antwortverhalten zu tieffrequenten Reintönen zeigen, allerdings scheint fraglich ob ihre Sensitivität und Zeitauflösung dabei der normal adulter MSO-Neurone entspricht. Durch die Physiologie der Eingänge sollte deshalb auch in UCA-MSO-Neuronen eine, wie auch immer geartete, zeitliche Abstimmung zwischen dem erregenden und den hemmenden Eingängen vorliegen. Wenn man diesem Gedanken folgt, könnte neben bloßer Aktivität auch eventuell eine Art von monauraler Koinzidenzdetektion oder einer anderen Form der zeitlichen Interaktion von Erregung und Hemmung ausreichen, um eine räumliche

Differenzierung der glycinergen Synapsen bei UCA-MSO-Neuronen zu steuern. Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, treffen diese Annahmen nicht zu. Sowohl ipsilateral, als auch contralateral zur entnommenen Cochlea gelegene MSO-Neurone zeigten eine identische, homogene Verteilung der glycinergen Synapsen. In beiden MSO-Nuclei konnte also die normale adulte Verteilung der glycinergen Eingänge nicht durch eine rein monaurale Stimulation etabliert werden. Daraus lässt sich ableiten, dass die einfache Aktivität der Eingänge oder spezifischer, monaural phasengekoppelter Eingänge, nicht ausreicht um die Entwicklung einer räumlichen Differenzierung der glycinergen Inhibition bei MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus zu steuern. Ein Mechanismus, welcher auf monauraler Koinzidenzdetektion oder einer anderen Form der zeitlichen Interaktion monaural erregender und hemmender Eingänge beruht, kann daher ebenfalls nicht der Entwicklung einer räumlich differenzierten Verteilung inhibitorischer Eingänge an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus zugrundeliegen. Vielmehr scheint in besonderem Maße eine binaurale Aktivierung der erregenden und hemmenden Eingänge notwendig zu sein, damit diese Entwicklung stattfinden kann. Wenn allerdings nur eine binaurale Aktivierung der Eingänge zur Steuerung dieser Entwicklung notwendig wäre, dann wäre es verwunderlich, dass Ratten-MSO-Neurone, die ebenfalls vollständig binaurale Eingänge erhalten, keine räumliche Beschränkung der glycinergen Eingänge entwickeln. Dieser scheinbare Widerspruch löst sich allerdings auf, wenn man die Funktion der MSO-Neurone bei der ITD-Verarbeitung und die Relevanz der Inhibition bei dieser Aufgabe mit in Betracht zieht. Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt wurde, ist es für MSO-Neurone der Ratte im Gegensatz zu MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus sehr unwahrscheinlich, dass sie ITDs im  $\mu$ s-Bereich auswerten (s.h. Kapitel 5.2.3). Die räumliche Beschränkung der inhibitorischen Eingänge scheint zudem eine spezifische und notwendige zelluläre Anpassung an die Anforderungen einer  $\mu$ s-genauen Zeitauflösung bei der ITD-Verarbeitung in tieffrequent hörenden und ITD-nutzenden Tieren darzustellen (s.h. Kapitel 5.2.1 – 4). Es scheint daher sinnvoller, die Interpretation der UCA-Ergebnisse vor dem Hintergrund der Funktion der MSO-Neurone in der ITD-Verarbeitung zu erweitern und anzunehmen, dass nicht allein binaurale Aktivität, sondern die akustische Erfahrung verhaltensrelevanter räumlicher Stimuli, also komplexe, zeitlich genau aufeinander abgestimmte binaurale Aktivitätsmuster notwendig sein könnten, diese Entwicklung zu steuern. Tatsächlich lassen Experimente mit Wüstenrennmäusen, die von Postnataltag 10 bis 25 unter ständiger Beschallung mit einem weißen Rauschen aus allen Raumrichtungen aufgezogen wurden, diese Annahmen plausibel erscheinen (NRA-Tiere; Seidl & Grothe 2003). Durch das weiße Rauschen mittlerer Intensität werden verhaltensrelevante,

räumliche akustische Stimuli weitgehend maskiert (Seidl & Grothe 2003, Withington-Wray et al. 1990) und stehen den Tieren somit in der entscheidenden Entwicklungsphase zwischen Hörbeginn (P12) und Ausreifung des Hörsystems (P21) nicht mehr zur Verfügung. Für die MSO-Neurone bedeutet diese Manipulation der auditorischen Erfahrung, dass sie zwar permanent binaural aktiviert werden, diese Aktivierung ist jedoch im Gegensatz zu normaler Hörerfahrung durch das weiße Rauschen räumlich dekorreliert und damit in Bezug auf eine bestimmte Position im Azimut bedeutungslos. Nach der oben aufgestellten Hypothese sollte aber gerade eine spezifische, zeitlich korrelierte Stimulation der binaural hemmenden Eingänge zur MSO die Entwicklung einer räumlichen Beschränkung der glycinergen Synapsen steuern. Man würde daher erwarten, dass diese anatomische Entwicklung in den NRA-Tieren nicht oder nur unzureichend stattfinden kann. Wie die immunhistochemische Untersuchung der Verteilung markierter Glycinrezeptorcluster an NRA-MSO-Neuronen zeigen kann, ist genau dies der Fall (Kapfer et al. 2002; Seidl & Grothe 2003). Im Gegensatz zu normal adulten Wüstenrennmäusen und in Übereinstimmung zu den Ergebnissen in UCA-Tieren, zeigen die Glycinrezeptorcluster an NRA-MSO-Neuronen keine räumliche Beschränkung auf die Somaregion (Kapfer et al. 2002; Seidl & Grothe 2003). Obwohl die Aufzucht unter weißem Rauschen (NRA) nicht die gleichen, dramatischen Auswirkungen auf die Verteilung der glycinergen Synapsen wie die Monauralisierung des Systems (UCA) zeigt, können doch an NRA-MSO-Neuronen signifikant mehr inhibitorische Synapsen an den Dendriten als in normal adulten Tieren festgestellt werden (Kapfer et al. 2002; Seidl & Grothe 2003). Die Unterschiede zwischen NRA- und UCA-Wüstenrennmäusen sind dabei nicht überraschend, da, wie bereits dargestellt, der operative Eingriff eine völlige Umgestaltung der erregenden und hemmenden Schaltkreise zur Folge hat, wogegen die nicht-invasive Aufzucht unter Rauschen spezifisch nur die erfahrbaren akustischen Stimuli verändert. Die im Vergleich zur Monauralisierung des System sogar geringere Anzahl an dendritischen inhibitorischen Synapsen reicht offensichtlich schon aus, die zeitliche Abstimmung der inhibitorischen Eingänge und damit das Antwortverhalten der DNLL-Neurone adulter NRA-Tiere bei der ITD-Verarbeitung im Vergleich zu normal adulten Tieren massiv zu verändern (Seidl & Grothe 2003; s.h. Kapitel 5.2.4). Nach diesen Ergebnissen scheint es daher sehr wahrscheinlich, dass die nach Hörbeginn stattfindende Entwicklung hin zu einer räumlichen Beschränkung der glycinergen Eingänge von der Erfahrung verhaltensrelevanter Schallsignale abhängt, welche an der MSO-Zelle durch eine genaue zeitliche Korrelation in ihrem binauralen Aktivitätsmuster zu einer selektiven Stabilisierung oder Entfernung von inhibitorischen Synapsen führen würde. Dabei würden



selektiv die glycinergen Synapsen, deren zeitliche Abstimmung in Bezug auf die erregenden Eingänge nicht zu einer Erhöhung der ITD-Sensitivität beiträgt, eliminiert werden (Dendriten) und nur die Synapsen, welche zum richtigen Zeitpunkt aktiv sind, würden erhalten werden (Soma). Da diese mögliche Plastizität des „Erlernens“ der ITD-Sensitivität mittels verhaltensrelevanter, binauraler akustischer Stimulation durch die Monauralisierung des Systems (UCA, diese Arbeit) einerseits und durch die Maskierung relevanter Signale (NRA, Kapfer et al. 2002; Seidl & Grothe 2003) andererseits verhindert wird, kann sich auch die räumliche Beschränkung der inhibitorischen Eingänge nicht ausbilden.

Der zeitliche Rahmen in dem diese erfahrungsabhängige Entwicklung ablaufen kann, dürfte sich maximal auf die ersten 14 Tage nach Hörbeginn beschränken. Wie eine immunhistochemische Untersuchung der Verteilung glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus in verschiedenen Altersstufen nach Hörbeginn (P12 – P19; Ehrhardt 2000) nahelegt, ist qualitativ frühestens am Postnataltag 15 eine Tendenz und am Postnataltag 17 eine merkliche räumliche Beschränkung der glycinergen Synapsen auf die Somaregion zu erkennen, welche sich bis zur letzten untersuchten Altersstufe (P19) noch weiter verdeutlicht (Ehrhardt 2000). Allerdings erreicht das Ausmaß der räumlichen Beschränkung bei P19-Wüstenrennmäusen qualitativ nicht das Niveau der jüngsten (P25) in der adult-Gruppe dieser Arbeit zusammengefassten Altersstufen. Es ist daher davon auszugehen, dass die Entwicklung am Postnataltag 19 in der Wüstenrennmaus noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Ob sie allerdings bis zum Postnataltag 25 fortschreitet oder möglicherweise bereits früher, eventuell am Postnataltag 21 mit der physiologischen Ausreifung des SOC's abgeschlossen ist, kann auf Basis der vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. Da in adulten Wüstenrennmäusen weder eine einseitige Cochleaentnahme (Suneja et al. 1998a,b), noch eine Beschallung mit omnidirektionalem weißem Rauschen (Seidl & Grothe 2003) spezifische Abweichungen vom normal adulten Muster der räumlichen Beschränkung glycinergen Eingänge induzieren können, müsste sich die plastische Zeitphase für die Entwicklung einer Kompartimentierung der inhibitorischen Eingänge auf die ersten Tage nach Hörbeginn beschränken.

Eine aktivitätsabhängige Elimination und Stabilisierung von erregenden Projektionen während der Entwicklung scheint ein sowohl im peripheren wie zentralen Nervensystem weit verbreitetes Phänomen zu sein. Ein besonders intensiv untersuchtes System ist dabei die Entwicklung der acetylcholinergen Innervation der peripher gelegenen neuromuskulären Endplattensynapse bei Wirbeltieren (Keller-Peck et al. 2001; s.h. auch den Übersichtsartikel Lichtman & Coleman 2000). Embryonal und während der ersten

postnatalen Wochen werden die Muskeln dabei durch eine Vielzahl von Axonen verschiedener Motoneurone in einem diffusen Muster innerviert (Balice-Gordon et al. 1993; Gan & Lichtman 1998). Im Verlauf der Entwicklung werden durch aktivitätsabhängige Verdrängungsprozesse, welche unter anderem auf der relativen Aktivität im Wettbewerb stehender Axone beruhen (Busetto et al. 2000), überzählige synaptische Kontakte abgebaut, bis ausgereifte Muskeln nur noch von einem Axon eines Motoneurons und damit von einer Endplattensynapse innerviert werden (Keller-Peck et al. 2001; s.h. auch den Übersichtsartikel Lichtman & Coleman 2000). Zentral im Gehirn kann eine aktivitätsabhängige Eliminierung erregender Synapsen unter anderem im Cerebellum bei der Etablierung des Kletterfasereinganges zu Purkinjezellen (Crepel et al. 1976; Ichise et al. 2000; Kakizawa et al. 2000; s.h. auch den Übersichtsartikel Lohof et al. 1996), sowie bei der Verfeinerung der thalamocorticalen Eingänge zu Neuronen der Schicht IV des visuellen (Chapman et al. 1986; Hubel et al. 1977; Katz & Shatz 1996) und somatosensorischen (s.h. den Übersichtsartikel O’Leary et al. 1994) Cortex beobachtet werden. Im Gegensatz zu erregenden Projektionen sind nur vergleichsweise wenige Beispiele für eine aktivitätsabhängige Elimination und Stabilisierung inhibitorischer Projektionen bekannt. Ein Beispiel für eine solche Entwicklung ist dabei wieder im auditorischen System der Wüstenrennmaus, in der bereits erwähnten glycinergen Projektion von MNTB-Neuronen zu Zellen der LSO zu finden. Anatomische Untersuchungen können dabei nachweisen, dass die Genauigkeit, mit der die glycinergen MNTB-Projektionen ihr frequenzspezifisches Zielgebiet in der LSO innervieren, entscheidend von der Aktivität der contralateral zur untersuchten LSO gelegenen Cochlea abhängt (Sanes & Takacs 1993). Wird diese Aktivität blockiert, so wachsen die MNTB-Axone unkontrolliert aus, sie verzweigen sich stärker und es werden deutlich mehr Synapsen mit LSO-Zellen gebildet (Sanes & Takacs 1993). Dies resultiert in einer völlig ungeordneten Innervation verschiedener Areale über die gesamte LSO. Die in normal adulten Wüstenrennmäusen erkennbare Verfeinerung und Einengung der MNTB-Projektionen innerhalb spezifischer Frequenzkanäle entlang der tonotopen Achse des Nucleus (Sanes & Siverls 1991; Sanes et al. 1989) kann sich daher nicht entwickeln (Sanes & Takacs 1993). Wie weitere Studien an der LSO der Wüstenrennmaus (Sanes et al. 1992a,b) und der Ratte (Rietzel & Friauf 1998) nachweisen können, ist auch die Morphologie der Dendritenbäume entlang der tonotopen Frequenzbänder in der LSO von einer Luftschall induzierten Aktivität der hemmenden Eingänge abhängig. Ob sich die in der Untersuchung der MNTB – LSO – Projektion beschriebene, aktivitätsabhängige Verfeinerung des axonalen Verzweigungsmusters von MNTB-Neuronen auch im

Zusammenhang mit der in dieser Arbeit beschriebenen aktivitäts- / erfahrungsabhängigen räumlichen Differenzierung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen zeigt, müsste durch weitere Untersuchungen geklärt werden. Diese Untersuchungen könnten durch intrazelluläre Markierung von MNTB-Neuronen verschiedener Altersstufen nach Hörbeginn bei *in vitro* Experimenten an Hirnschnitten des SOCs normaler und manipulierter Wüstenrennmäuse und normaler Ratten erfolgen. Mit einem solchen Experiment könnte auch der Frage nachgegangen werden, ob während der Entwicklung der räumlichen Beschränkung der glycinergen Eingänge ganze Axonbäume von bestimmten MNTB-Zellen oder nur falsch positionierte Collaterale eines Axonbaums selektiv eliminiert werden, wohingegen andere, beispielsweise am Soma lokalisierte Synapsen, erhalten werden, bzw. neu gebildet werden.

Im Unterschied zur gerade diskutierten Entwicklung in der LSO, welche eine Selektion von Eingängen auf der Ebene einer größeren Population von Zellen darstellt, beruht die in dieser Arbeit präsentierte erfahrungsabhängige Entwicklung der inhibitorischen Projektionen in der MSO allerdings auf einer Selektion weniger, zeitlich genau korrelierter Eingänge auf dem Niveau eines Kompartiments (Soma) einzelner Zellen. Auch in anderen Systemen wurde eine Beschränkung inhibitorischer Eingänge auf bestimmte Kompartimente einzelner Zellen beschrieben, wobei je nach Zelltyp und System eine erhebliche Variabilität in der Kompartimentierung vorzuliegen scheint. So zeigen retinale Ganglienzellen bei Affen eine deutliche Präferenz glycinerge Synapsen auf die distalen Dendriten zu beschränken (Lin et al. 2000), wohingegen sich glycinerge und GABAerge Projektionen zu Renshawzellen des Rückenmarks auf die Somata und proximalen Dendriten beschränken (Alvarez et al. 1997). GABAerge Projektionen zu Pyramidenzellen des Hippocampus (Craig et al. 1994; Nyiri et al. 2001; s.h. auch den Übersichtsartikel Freund & Buzsaki 1996) und des Neocortex (Schicht V; Kawaguchi & Kubota 1997) weisen je nach Interneuronentyp entweder eine räumliche Beschränkung auf die Zellkörper und proximalen Dendriten oder auf die distalen Dendriten auf. Im Unterschied zur räumlichen Beschränkung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen ist in den eben genannten Systemen allerdings weitgehend unklar, welche spezifischen Funktionen eine räumliche Differenzierung leisten könnte. Lediglich für somatische GABAerge Projektionen zu Pyramidenzellen des Hippocampus konnte bisher eine spezifische Rolle bei der Verschärfung des Zeitfensters für eine Koinzidenzdetektion erregender Eingänge nachgewiesen werden (Pouille & Scanziani 2000; s.h. auch Kapitel 5.2.4).

### 5.3.2 Mögliche zelluläre Mechanismen der erfahrungsabhängigen Entwicklung

Für den möglichen Mechanismus, welcher der Entwicklung einer räumlich auf die Somaregion beschränkten Verteilung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen in adulten Wüstenrennmäusen zugrundeliegen könnte, stehen prinzipiell mehrere alternative Modelle zur Verfügung. Der einfachste Mechanismus würde dabei auf einer reinen Konkurrenz zwischen den erregenden und hemmenden Synapsen beruhen. Durch stärkere erregende Projektionen aus dem AVCN zu den Dendriten, würde sich während der Entwicklung ein zugunsten erregender Eingänge verschobenes Ungleichgewicht im Verhältnis erregender zu hemmender Synapsen bilden. Der daraus entstehende Wettbewerb zwischen erregenden und hemmenden Synapsen um Raum an den Dendriten könnte dann zur Folge haben, dass die inhibitorischen Synapsen nach und nach vom Dendriten verdrängt werden. Dieses Modell scheint zwar durch seine Einfachheit überzeugend, ist aber aus mehreren Gründen unwahrscheinlich. So kann es vielleicht die Eliminierung von inhibitorischen Synapsen am Dendriten erklären, liefert aber keine schlüssigen Argumente für die Erhaltung der glycinergen Synapsen am Soma. Auch die Ergebnisse in UCA-Wüstenrennmäusen sprechen gegen dieses Modell. Da die UCA-Tiere ebenfalls erregende Eingänge vom intakten Ohr auf beide Dendriten erhalten (Kitzes et al. 1995; Russell & Moore 1995) und der inhibitorische Eingang auf der ipsilateralen Seite etwas schwächer sein müsste, sollte sich nach diesem Modell, eine dem normal adulten Tier entsprechende Verteilung der glycinergen Eingänge entwickeln. Wie die Daten zeigen, ist dies nicht der Fall. Auch die in Kapitel 5.3.1 diskutierten NRA-Tiere müssten nach diesem Modell eine normal adulte Verteilung der Glycinrezeptoren aufweisen, da sie anatomisch dieselben intakten binauralen Eingänge wie Kontrolltiere erhalten. Wie in Kapitel 5.3.1 diskutiert, trifft die Annahme des Modells auch für NRA-Tiere nicht zu. Betrachtet man zusätzlich die Verteilung der glycinergen Eingänge an MSO-Zellen adulter Ratten, so stellt sich die Frage, warum ein solcher hypothetischer Verdrängungsmechanismus bei diesen Zellen nicht zum Tragen kommt, obwohl sie im Prinzip dieselben erregenden und hemmenden Eingänge wie MSO-Neurone adulter Wüstenrennmäuse erhalten. Es erscheint daher nicht plausibel die beobachtete räumliche Differenzierung glycinерger Synapsen durch ein Modell synaptischer Konkurrenz zu beschreiben.

Neben einer einfachen synaptischen Konkurrenz scheint aufgrund der präsentierten Daten auch ein von akustischer Stimulation unabhängiger Mechanismus, wie er von Kim & Kandler (2003) für die Verfeinerung der glycinergen Eingänge entlang der tonotopen Achse in der LSO vorgeschlagen wurde, nicht als Erklärungsansatz in Frage zu

kommen. Bei diesem, rein auf einer Spontanaktivität in den Eingängen gründenden Mechanismus würde eine funktionelle Selektion von Eingängen und damit eine Stabilisierung oder Elimination von Synapsen in der LSO am Postnataltag 8 (P8), also vier Tage vor Hörbeginn, abgeschlossen sein, während eine anatomische Selektion der Eingänge (s.h. Rietzel & Friauf 1998, Sanes & Siverls 1991) der funktionellen Selektion mit einer Zeitverzögerung von bis zu 14 Tagen folgen würde (Kim & Kandler 2003). Physiologisch basiert dieser Mechanismus vorallem auf der Tatsache, dass glycinerge Eingänge in SOC-Neuronen jünger als P8 aufgrund einer stark erhöhten intrazellulären Chloridionenkonzentration und eines damit positiv zum Ruhepotential liegenden Umkehrpotentials für Chlorid nicht hyperpolarisierend sondern depolarisierend auf die postsynaptische Zelle wirken (Ehrlich et al. 1999; Kandler & Friauf 1995b). Damit könnte die Eliminierung von glycinergen Synapsen über dieselben, calziumabhängigen zellulären Mechanismen erfolgen, wie sie bereits für eine Vielzahl von erregenden Systemen beschrieben sind (Kim & Kandler 2003; Kullmann et al. 2002). Aus mehreren Gründen erscheint es aber unwahrscheinlich, dass ein solcher Mechanismus auch der Kompartimentierung der glycinergen Synapsen an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus zugrundeliegt. Wenn nur eine Spontanaktivität der Eingänge benötigt würde, um zu einer Eliminierung von dendritischen Synapsen zu kommen, dann müsste eine solche Elimination auch in Ratten-MSO-Neuronen zu finden sein, welche, wie mehrfach erwähnt, dieselben Eingänge erhalten wie MSO-Neurone der Wüstenrennmaus. Auch die Ergebnisse in Wüstenrennmäusen mit manipulierter auditorischer Erfahrung lassen sich nicht durch einen solchen Mechanismus erklären. Speziell NRA-Tiere (s.h. Kapitel 5.3.1) müssten demnach ebenfalls eine räumliche Beschränkung der glycinergen Synapsen aufweisen, da sie im Prinzip dieselbe Spontanaktivität vor Hörbeginn erfahren wie normale Kontrolltiere. Die Manipulation der Erfahrung durch das weiße Rauschen ab P10 sollte daher keine Auswirkungen mehr zeigen. Die Ergebnisse bei UCA-Tieren dagegen könnten sich theoretisch mit einem solchen Modell erklären lassen. Durch die Entnahme einer Cochlea könnte es prinzipiell zu einer Reduzierung der Cochlea-vermittelten Spontanaktivität in den glycinergen Eingängen zu MSO-Neuronen kommen, was zu einer Störung des hypothetischen Selektionsprozesses und damit zu einer diffusen Anordnung der Synapsen führen könnte. Besonders der Zeitpunkt der Cochleaentnahme vor Hörbeginn wäre nach diesem Modell entscheidend für die zu erwartenden Effekte. Eine Cochleaentnahme an P7, wie sie in der Arbeit durchgeführt wurde, könnte also möglicherweise Auswirkungen auf die Verteilung glycinerner Synapsen haben, da zu diesem Zeitpunkt die glycinergen Eingänge noch erregend wirken und nach

Kim & Kandler (2003) der Selektionsprozess der Eingänge, also die Phase funktioneller Plastizität, in der LSO erst an P8 abgeschlossen ist. Da zwischen der Cochleaentnahme an P7 und dem Ende dieser plastischen Phase in der LSO nur maximal 24 h liegen, müsste die Reduktion der Spontanaktivität in den Eingängen durch die Cochleaentnahme allerdings sehr schnell erfolgen, um sich, nach diesem Modell, noch auf die Selektion der Eingänge auszuwirken. Es erscheint jedoch unklar, ob sich die Spontanaktivität durch die Cochleaentnahme an P7 tatsächlich innerhalb nur weniger Stunden schon merklich reduziert. Obwohl durch die Vertäubung sofort jegliche Cochlea-vermittelte Spontanaktivität beseitigt wird, könnten unabhängig davon beispielsweise die GBCs des AVCN immer noch eine Spontanaktivität zeigen, welche möglicherweise ausreicht den hypothetischen Selektionsmechanismus zu steuern. Da auch Kim & Kandler (2003) nichts über den Ursprung und die notwendige Stärke der Spontanaktivität aussagen können und da die Auswirkungen einer Cochleaentnahme auf die Spontanaktivität der AVCN-Zellen bislang nicht untersucht wurden, kann diese Möglichkeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Wenn nun eine Spontanaktivität der Eingänge ausreicht, den hypothetischen Selektionsmechanismus zu steuern, dann dürfte es nach diesem Modell eher unwahrscheinlich sein, dass sich nach einer Cochleaentnahme an P7 eine diffuse Anordnung der Synapsen entwickelt. Auch eine Cochleaentnahme am Postnataltag 10, wie sie ebenfalls in der Arbeit durchgeführt wurde, sollte nach diesem Modell keine Auswirkungen auf die Verteilung der glycinergen Synapsen haben. Denn einerseits wirken die glycinergen Synapsen an P10 bereits hyperpolarisierend und andererseits sollte die Selektion ohnehin schon an P8 (Kim & Kandler 2003) abgeschlossen sein. Die untersuchten UCA-MSO-Neurone sollten daher, unabhängig vom Zeitpunkt der Vertäubung, eine räumlich beschränkte Verteilung der glycinergen Synapsen aufweisen. Wie aus den Daten der UCA-Tiere hervorgeht, ist dies jedoch nicht der Fall. Die gesamte Population der untersuchten MSO-Neurone von UCA-Tieren zeigte eine homogene Verteilung glycinerner Synapsen. Ein von auditorischer Stimulation unabhängiger Mechanismus, wie er von Kim & Kandler (2003) für die Elimination glycinerner Synapsen in der LSO vorgeschlagen wurde, scheint daher nicht geeignet die beobachtete Entwicklung in der MSO der Wüstenrennmaus zu beschreiben.

Wie bereits in Kapitel 5.3.1 diskutiert, scheint es viel wahrscheinlicher den unterliegenden Mechanismus unter dem Gesichtspunkt der Funktion der MSO bei der ITD-Verarbeitung zu suchen. Im Speziellen sollte die genaue zeitliche Abstimmung zwischen den erregenden und hemmenden Eingängen zu einer selektiven Stabilisierung glycinerner Synapsen am Soma und zu einer Elimination an den Dendriten führen. Der räumlichen

Differenzierung der glycinergen Synapsen sollte also ein stimulusabhängiger, aktiver Prozess zugrundeliegen. Dieser aktive Mechanismus könnte dafür sorgen, dass nur die hemmenden Synapsen erhalten werden, deren Aktivierung in einer korrekten zeitlichen Abstimmung mit der Erregung erfolgt. Die inhibitorischen Eingänge, die relativ zur Erregung zu früh oder zu spät aktiv sind, würden durch diesen Mechanismus nicht verstärkt sondern abgeschwächt und würden in der Folge verschwinden. Obwohl die Natur dieses Mechanismus zum jetzigen Zeitpunkt noch rein spekulativ ist, wäre ein modifizierter Hebb'scher Mechanismus denkbar. Bei diesem sog. STDP-Mechanismus („spike timing-dependent plasticity“) ist die exakte Korrelation des prä- und postsynaptischen Aktionspotentials innerhalb eines bestimmten, meist asymmetrischen Zeitfensters entscheidend, um eine gegebene Synapse langfristig zu verstärken (LTP; „long term potentiation“) oder abzuschwächen (LTD; „long term depression“) (s.h. die Übersichtsartikel Abbott & Nelson 2000; Bi & Poo 2001). Dieses Zeitfenster gliedert sich daher im Prinzip in zwei Teilbereiche der relativen zeitlichen Korrelation zwischen prä- und postsynaptischer Aktivität. Am Zeitpunkt Null, an welchem prä- und postsynaptische Aktivität absolut koinzident auftreten, besteht nach diesem Modell für eine Verstärkung oder Abschwächung einer Synapse die gleiche Wahrscheinlichkeit (s.h. die Übersichtsartikel Abbott & Nelson 2000; Bi & Poo 2001). Tritt das präsynaptische Aktionspotential innerhalb einer sehr kurzen Zeitspanne (wenige Millisekunden in den meisten untersuchten Systemen) vor dem postsynaptischen Aktionspotential auf, wird die Effektivität und damit die Stärke der Synapse erhöht, es entsteht LTP (s.h. die Übersichtsartikel Abbott & Nelson 2000; Bi & Poo 2001). Tritt das präsynaptische Aktionspotential dagegen in einer gewissen Zeitspanne nach dem postsynaptischen Aktionspotential auf, wird das Gewicht der Synapse geschwächt und es entsteht LTD (s.h. die Übersichtsartikel Abbott & Nelson 2000; Bi & Poo 2001). Die durch einen STDP-Mechanismus gesteuerte Verstärkung und Abschwächung von Synapsen mittels LTP und LTD ist bisher physiologisch in einer Vielzahl von Systemen für erregende Synapsen beschrieben worden, beispielsweise *in vitro* in Pyramidenzellen des Hippocampus (Bi & Poo 1998; Levy & Steward 1983; Magee & Johnston 1997) und des Neocortex (Egger et al. 1999; Markram et al. 1997), sowie *in vivo* in der retino-tectalen Projektion in Kaulquappen des Krallenfrosches (Zhang et al. 1998b) und im primären visuellen Cortex der Katze (Schuett et al. 2001). Durch eine Reihe von neuronalen Modellen zur Entwicklung von Augendominanzkolumnen (Miller et al. 1989) und rezeptiver Felder im primären visuellen Cortex (Miller 1994a; Rao & Sejnowski 2001, 2003; Senn et al. 2002) wurde zudem vorgeschlagen, dass einem STDP-Mechanismus und damit spezifisch der

zeitlichen Korrelation in der Aktivität von Eingängen, eine wichtige Rolle bei der Entwicklung dieser Systeme zukommt (s.h. auch die Übersichtsartikel Miller 1994b; Senn 2002). Im auditorischen System schlägt ein von Gerstner et al. (1996) entwickeltes, neuronales Modell ein, auf dem STDP-Mechanismus basierendes Lernfenster zur Entwicklung einer  $\mu$ s-genauen Zeitauflösung bei der Koinzidenzdetektion erregender Eingänge in Neuronen des Nucleus Laminaris der Schleiereule vor. Obwohl die genannten Mechanismen synaptischer Plastizität nur im Zusammenhang mit erregenden Synapsen entwickelt wurden, mehren sich Hinweise, dass auch inhibitorische Synapsen eine aktivitätsabhängige Veränderung der synaptischen Stärke zeigen können, welche in den meisten Fällen von der zeitlichen Korrelation zwischen Prä- und Postsynapse abhängen. So zeigen beispielsweise GABAerge Synapsen zu Pyramidenzellen des Neocortex bei koinzidenter Stimulation der prä- und postsynaptischen Seite eine Zunahme der synaptischen Effektivität, also LTP, und bei zeitlich um etliche Millisekunden verschobener prä- und postsynaptischer Aktivität eine deutliche Abschwächung der synaptischen Stärke, also LTD (Holmgren & Zilberter 2001; Komatsu 1994, 1996; Komatsu & Iwakiri 1993; Komatsu & Yoshimura 2000). Auch im Cerebellum (Aizenman et al. 1998; Morishita & Sastry 1993; Ouardouz & Sastry 2000) und Hippocampus (Kang et al. 1998; Lu et al. 2000; Stelzer et al. 1994) werden GABAerge Synapsen verstärkt oder abgeschwächt, je nachdem in welcher zeitlicher Relation Prä- und Postsynapse aktiv sind. Ein, im Sinne der Studien an erregenden Synapsen, leicht abgewandelter STDP-Mechanismus wurde jüngst an GABAergen Eingängen zu Pyramidenzellen des Hippocampus nachgewiesen (Woodin et al. 2003). Dabei werden die GABAergen Synapsen immer dann verstärkt wenn prä- und postsynaptisches Aktionspotential in einem Zeitintervall von insgesamt 40 ms um den Nullpunkt (volle Koinzidenz) zusammenfallen, unabhängig ob die präsynaptische Aktivität vor oder nach der postsynaptischen Aktivität auftritt. Erst wenn die präsynaptische Aktivität mehr als 20 ms vor oder nach dem postsynaptischen Aktionspotential auftritt, werden die Synapsen geschwächt (Woodin et al. 2003). Nicht nur GABAerge, sondern auch glycinerge Synapsen zeigen eine aktivitätsabhängige Veränderung ihrer synaptischen Stärke. So konnte beispielsweise an glycinergen Synapsen zur Mauthnerzelle im Goldfisch unter elektrischer Stimulation *in vitro* (Korn et al. 1992; Oda et al. 1995) und mit natürlichen akustischen Stimuli *in vivo* (Oda et al. 1998) eine langfristige Verstärkung der synaptischen Stärke, also LTP, beobachtet werden. Interessanterweise zeigen auch die glycinergen Synapsen der MNTB – LSO – Projektion in der Wüstenrennmaus während der Entwicklungsphase, in der eine Selektion dieser Eingänge entlang der tonotopen Achse



stattfindet (s.h. Kapitel 5.3.1), eine alters- und aktivitätsabhängige Reduzierung der synaptischen Stärke (LTD; Chang et al. 2003; Kotak & Sanes 2000, 2002; Kotak et al. 2001).

Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass auch für die Selektion inhibitorischer Eingänge in der MSO der Wüstenrennmaus ein, wie auch immer gearteter, STDP-Mechanismus Anwendung finden könnte. Es wäre daher ebenfalls anzunehmen, dass hierbei ähnliche Lernregeln gelten, wie sie für eine Plastizität erregender und hemmender Synapsen anderer Systeme beschrieben wurden. Eine inhibitorische Synapse müsste demnach verstärkt werden, wenn sie zeitlich kurz vor oder gleichzeitig mit dem, durch Koinzidenz erregender Eingänge ausgelösten Aktionspotential der MSO-Zelle aktiviert wird. Würde sie viel früher oder eventuell wenig später aktiviert, müsste sie geschwächt werden und könnte in der Folge eliminiert werden. Eine Selektion der somatischen und Elimination der dendritischen Synapsen erscheint in diesem Zusammenhang möglich, wenn man bedenkt, dass die glycinergen Eingänge an den Dendriten durch die größere Distanz zum Axonhügel mit einer größeren Wahrscheinlichkeit als somatische Synapsen nicht in enger zeitlicher Korrelation zum postsynaptischen Aktionspotential aktiv sein können. Der entscheidende Punkt dürfte hierbei nun in der Länge des STDP-Zeitfensters liegen, welches den Bereich für eine Verstärkung oder Abschwächung der Synapsen vorgibt. Bei einem Zeitrahmen von wenigen hundert von  $\mu\text{s}$  für eine Interaktion von Erregung und Hemmung bei der ITD-Verarbeitung in der MSO müsste auch das STDP-Zeitfenster, welches die Selektion der Synapsen steuert und damit im Endeffekt zur Entwicklung der im adulten Tier funktionell notwendigen Kinetik der Inhibition führt, in diesem Bereich liegen. Dafür würde auch der Befund sprechen, dass nur durch eine binaurale Stimulation mit natürlich korrelierten Schallsignalen, also mit Signalen welche in den MSO-Zellen durch eine Phasenkopplung in genau diesem Zeitbereich interagieren, die anatomische Selektion inhibitorischer Synapsen gesteuert werden kann und ein normales physiologisches Verhalten der Zellen gleichsam „erlernt“ werden kann. Wenn also das STDP-Zeitfenster nur einen Sub-Millisekundenbereich für ein Zusammentreffen von prä- und postsynaptischer Aktivität zur Verstärkung von Synapsen einräumt, dann dürften schon geringe zeitliche Abweichungen der präsynaptischen von der postsynaptischen Aktivität ausreichen, um nicht mehr LTP sondern LTD an diesen außerhalb des STDP-Zeitfensters aktiven Synapsen zu induzieren. Durch ihre Lage nahe zum Axonhügel dürfte es daher für inhibitorische Synapsen am Soma eher wahrscheinlich sein, regelmäßig innerhalb des STDP-Zeitfensters mit dem postsynaptischen Aktionspotential aktiv zu sein und damit verstärkt zu werden. Für weiter entfernt vom Soma auf den Dendriten gelegene

inhibitorische Synapsen dagegen, ist es aufgrund der, wenn auch kleinen, räumlichen Entfernung zwischen Synapse und Axonhügel eher unwahrscheinlich regelmäßig innerhalb des STDP-Zeitfensters mit der Postsynapse aktiv zu sein. Daher würde sich die Stärke dieser Synapsen vermindern und LTD würde induziert werden. In der Folge könnten diese Synapsen zugunsten der verstärkten somatischen Synapsen aufgegeben werden und würden verschwinden. Da für eine Verstärkung oder Abschwächung von Synapsen im allgemeinen die Regelmäßigkeit der Aktivierung innerhalb oder außerhalb des STDP-Zeitfensters entscheidend ist (s.h. den Übersichtsartikel Bi & Poo 2001), dürfte eine zufällige synchrone Aktivierung von inhibitorischen Synapsen am Dendriten mit der postsynaptischen MSO-Zelle nicht zu einer Stabilisierung dieser Synapsen führen. Ob ein solcher STDP-Mechanismus mit einem auf  $\mu\text{s}$  abgestimmten Zeitfenster tatsächlich an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus vorliegt, bleibt aber im Moment noch spekulativ. Ein neuronales Modell zur aktivitätsabhängigen Entwicklung der ITD-Sensitivität von MSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus (Leibold 2002) unterstützt jedoch die Hypothese, dass ein solcher STDP-Mechanismus der Selektion glycinерger Synapsen zugrundeliegen könnte. Wie aus dem Modell hervorgeht, kann ein auf STDP basierender, selbstorganisierender Lernalgorithmus erregende und hemmende Synapsen mit spezifischer zeitlicher Korrelation im  $\mu\text{s}$ -Bereich auswählen und über die Zeit stabilisieren (Leibold 2002). Das Modell ist damit in der Lage die Entwicklung der physiologisch beobachteten Veränderung der ITD-Sensitivität im DNLL (Seidl & Grothe 2003) und damit in der MSO der Wüstenrennmaus zu erklären. Wie bereits in den Kapiteln 5.2.4 und 5.3.1 diskutiert, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Entwicklung der räumlichen Beschränkung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen und der Ausbildung einer ITD-Sensitivität, wie sie MSO-Neurone der adulten Wüstenrennmaus *in vivo* zeigen. Daher müsste man annehmen, dass der im oben genannten neuronalen Modell implementierte STDP-Mechanismus spezifisch der Selektion von zeitlich exakt korrelierten glycinерgen Eingängen zugrundeliegen könnte. Ob diese Möglichkeit zutrifft, müssen allerdings erst weitere Experimente klären. Dabei wäre vorallem wichtig herauszufinden, ob das notwendige, extrem kurze STDP-Zeitfenster tatsächlich in der MSO vorliegt. Vorallem, da eine Plastizität in GABAergen Eingängen zu Pyramidenzellen des Neocortex (Allen et al. 2003; Feldman 2000; Holmgren & Zilberter 2001) und des Hippocampus (Woodin et al. 2003) von sehr viel längeren STDP-Zeitfenstern im Bereich von mehreren hunderten (Feldman 2000; Holmgren & Zilberter 2001) bis zu 40 ms (Woodin et al. 2003) ausgeht. In diesen GABAergen Systemen ist das STDP-Zeitfenster, im Unterschied zu erregenden Systemen (Bi & Poo 1998; Egger et al. 1999;

Levy & Steward 1983; Magee & Johnston 1997; Markram et al. 1997), auch um den Bereich koinzidenter Aktivität symmetrisch. Dies bedeutet, egal ob das präsynaptische Aktionspotential vor oder nach dem postsynaptischen Aktionspotential auftritt wird entweder LTP (Woodin et al. 2003) oder LTD (Holmgren & Zilberter 2001) an den Synapsen induziert, solange die zeitliche Korrelation zwischen beiden innerhalb des STDP-Zeitfensters fällt. Es wäre daher auch wichtig zu wissen, ob die Plastizität glycinерger Synapsen in der MSO dieser Regel folgt, oder aber, ob beispielsweise präsynaptische Aktivität vor postsynaptischer Aktivität auftreten muss, um eine Verstärkung von Synapsen zu erreichen, wie dies bei erregenden Synapsen der Fall zu sein scheint.

Wie bereits angesprochen, könnte ein solcher hypothetischer STDP-Mechanismus zellulär zu einer selektiven Ausbildung von LTP an somatischen und LTD an dendritischen Synapsen führen. Über die zellulären Mechanismen die in der MSO dabei ablaufen könnten, kann zum jetzigen Zeitpunkt ebenfalls nur spekuliert werden. Wie allerdings alle Beispiele synaptischer Plastizität in erregenden und hemmenden Systemen nahelegen (s.h. die Übersichtsartikel Abbott & Nelson 2000; Bi & Poo 2001; Gaiarsa et al. 2002; Marty & Llano 1995), müsste dabei ein calziumabhängiger Prozess eine dominierende Rolle spielen. Wenn die Annahme zutrifft, dass somatische glycinerge Synapsen durch LTP verstärkt und dendritische glycinerge Synapsen durch LTD geschwächt werden, dann müsste dieser calziumabhängige Prozess in den verschiedenen Kompartimenten der Zelle differentiell wirken. Wie aus Untersuchungen an Pyramidenzellen des Hippocampus hervorgeht, scheint eine solche kompartimentabhängige Plastizität im Prinzip möglich zu sein (Stelzer et al. 1994). In diesem System kann durch einen heterosynaptischen Mechanismus, welcher eine Aktivierung von dendritischen NMDA-Rezeptoren mit anschließendem Calziumeinstrom benötigt, selektiv LTD in dendritischen GABAergen Synapsen induziert werden, wogegen GABAerge Synapsen am Soma nicht verändert werden (Stelzer et al. 1994). Eine Plastizität inhibitorischer Eingänge muss allerdings nicht zwingend von der Aktivität erregender Synapsen, also von einem heterosynaptischen Prozess abhängig sein. Wie die Arbeiten zum LTD der glycinergen MNTB – LSO – Projektion (Chang et al. 2003; Kotak & Sanes 2000; Kotak et al. 2001) und zum LTP der glycinergen Eingänge zur Mauthnerzelle im Goldfisch (Korn et al. 1992; Oda et al. 1995, 1998) zeigen können, sind glycinerge Eingänge selbst in der Lage diese Plastizität zu steuern. Es liegt also ein homosynaptischer Prozess vor. Das besonders intensiv an der MNTB – LSO – Synapse untersuchte LTD glycinерger Synapsen scheint dabei direkt von einer Zunahme des postsynaptischen Calziumniveaus abzuhängen (Kotak & Sanes 2000).

Da glycinerge Synapsen zu LSO-Neuronen in den untersuchten Altersstufen (P8 – P12; Chang et al. 2003; Kotak & Sanes 2000; Kotak et al. 2001) bereits funktionell inhibitorisch sind (Kotak & Sanes 1998), kann die postsynaptische Zunahme des Calciumniveaus bei einem homosynaptischen Mechanismus hier nicht durch die Aktivierung spannungsgesteuerter Calciumkanäle oder NMDA-Rezeptoraktivität erfolgen, welche nur durch eine Depolarisierung geöffnet werden können. Wie die Arbeiten zur MNTB – LSO – Projektion überzeugend nachweisen können, wird das LTD glycinерger Synapsen durch die Aktivität von GABA via postsynaptischer, metabotroper GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren und möglicherweise durch die Aktivität der Neurotrophine BDNF und NT3 über postsynaptische TrkB- und TrkC-Rezeptoren vermittelt (Chang et al. 2003; Kotak & Sanes 2002; Kotak et al. 2001). Diese Systeme könnten dann durch Aktivierung intrazellulärer Calciumspeicher zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumniveaus führen und damit über calciumgesteuerte Proteinkinasen wie die Calcium-Calmodulin-abhängige-Kinase-II (CaMKII) und die Proteinkinasen-A und C (PKA, PKC) zu einer Verminderung der Stärke glycinерger Synapsen führen (Chang et al. 2003; Kotak & Sanes 2002). Prinzipiell könnten diese zellulären Mechanismen auch bei einem hypothetischen LTD glycinерger Synapsen an den Dendriten von MSO-Neuronen eine Rolle spielen, da die MSO-Zellen ihre glycinergen Eingänge ebenfalls durch die Zellen des MNTB erhalten. Ob allerdings auch MSO-Neurone in der Entwicklung postsynaptische GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren aufweisen, müsste erst nachgewiesen werden. Da jedoch auch an MSO-Neuronen von Wüstenrennmäusen zwischen P12 und P21 postsynaptische TrkB- und TrkC-Rezeptoren immunhistochemisch nachgewiesen wurden (Hafidi et al. 1996), wäre zumindest eine LTD-Induktion durch MNTB-vermittelte Neurotrophinausschüttung (Hafidi 1999) möglich. Im Unterschied zur LSO, müsste dieser Mechanismus in der MSO allerdings deutlich später in der Entwicklung stattfinden. Während in der LSO das stärkste LTD glycinерger Synapsen bis P12 zu finden war und danach rapide abnahm (Kotak & Sanes 2000), dürfte dieser Mechanismus in der MSO aufgrund der Abhängigkeit der Entwicklung von natürlicher Schallstimulation frühestens an P12, wahrscheinlich aber erst ca. an P14 beginnen. Interessanterweise zeigen sich in der MSO der Wüstenrennmaus auch erst an P14 erste GABAerge Boutons von MNTB- oder LNTB-Zellen (Korada & Schwartz 1999). Dies könnte darauf hinweisen, dass ein möglicher LTD-Mechanismus erst deutlich später als in der LSO beginnen kann. Ein Problem bei diesem Mechanismus ist allerdings die fehlende Selektivität für ein bestimmtes Kompartiment der Zelle. Es wäre daher überzeugender einen heterosynaptischen Mechanismus anzunehmen, wie er für GABAerge Synapsen zu Pyramidenzellen des Hippocampus beschrieben wurde (Stelzer et al. 1994). Dabei würden

durch die depolarisierende Aktivität der dendritisch lokalisierten Glutamatrezeptoren entweder spannungsgesteuerte Calciumkanäle oder NMDA-Rezeptoren, welche im SOC bis ca. P16 nachweisbar sind (Futai et al. 2001; Kotak & Sanes 1996), aktiviert werden. Durch diese Aktivität könnte lokal am Dendriten Calcium einströmen und über die erwähnten Kinasesysteme die Glycinrezeptoren phosphorylieren. Eine Phosphorylierung von Glycinrezeptoren durch CaMKII, PKA und PKC wurde bereits für homomere  $\alpha 1$ - und native Glycinrezeptoren in verschiedenen Expressionssystemen (Gentet & Clements 2002; Ruiz-Gomez et al. 1991) sowie in Zellkulturen dissoziierter Neurone des Rückenmarks (Wang & Randic 1996; Xu et al. 1999, 2000) und des Trigeminskerns (Song & Huang 1990) gezeigt. Durch die Auswirkungen der Phosphorylierung von Glycinrezeptoren könnte die Stärke und Effizienz dieser Synapsen soweit vermindert werden, dass, ähnlich zur neuromuskulären Synapse (Busetto et al. 2000; Keller-Peck et al. 2001), die postsynaptischen Rezeptorcluster abgebaut werden und in der Folge die Synapse verschwindet. Dieses Modell könnte daher erklären, wie Synapsen an den Dendriten durch LTD geschwächt und in der Folge abgebaut werden können. Für die Erhaltung oder Verstärkung somatischer Synapsen lässt ein solches Modell viele Fragen offen. Die somatischen Synapsen könnten möglicherweise dadurch erhalten werden, dass das Calciumniveau im Soma durch bessere Puffersysteme für Calcium (Caicedo et al. 1998; Lohmann & Friauf 1996) oder das Vermeiden von lokalen Calciumwellen niedrig gehalten wird, so dass die LTD-Mechanismen nicht greifen können. Es ist aber im Moment nicht klar, wie eine Verstärkung dieser Synapsen vor sich gehen könnte, da im Prinzip auch bei LTP Calcium und dieselben Proteinkinasen und Proteine wie bei LTD involviert sind (s.h. den Übersichtsartikel Gaiarsa et al. 2002). Um dieser Frage nachzugehen, müsste zunächst untersucht werden, ob glycinerge Synapsen in der MSO überhaupt LTP zeigen können, oder spezifischer, ob die somatischen Synapsen selektiv verstärkt werden können, wenn gleichzeitig dendritische Synapsen geschwächt werden.

## **5.4 Entwicklung der intrinsischen und synaptischen Eigenschaften von MSO-Neuronen**

### **5.4.1 Entwicklung der intrinsischen Membraneigenschaften von MSO-Neuronen**

Wie aus den Ergebnissen hervorgeht, zeigen die biophysikalischen Membraneigenschaften der MSO-Neurone von Wüstenrennmäusen innerhalb der ersten zwei Tage nach Hörbeginn (P12 – P14) eine deutliche Verringerung des Eingangswiderstandes und der passiven Membranzeitkonstante, während in den drei folgenden Tagen bis P17 nur geringe Veränderungen zu beobachten waren. In diesem Zeitraum (P12 – P14) war zudem eine deutliche Reifung der spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten für Natrium- und Kaliumionen erkennbar. Diese Entwicklungen resultierten in den ältesten untersuchten MSO-Neuronen (P17) in sehr niedrigen Eingangswiderständen ( $2,9 - 9,2 \text{ M}\Omega$ ) und sehr schnellen Membranzeitkonstanten ( $0,35 - 0,71 \text{ ms}$ ), sowie einer markanten einwärts und auswärts gerichteten Gleichrichtung des Stroms. Im Ruhemembranpotential der Zellen zeigte sich dagegen keine altersabhängige Veränderung.

Mit einem durchschnittlichen Wert von  $-57 \pm 2 \text{ mV}$  lagen die hier untersuchten MSO-Neurone auf derselben Ebene wie MSO-Neurone in der adulten Wüstenrennmaus (Grothe & Sanes 1993:  $-56 \pm 4 \text{ mV}$ ; 1994:  $-51,2 \text{ mV}$ ), im adulten Meerschweinchen (Smith 1995:  $-58 - -67 \text{ mV}$ ) und in P3 – P14 Ratten (Smith et al. 2000:  $-58,3 \pm 1.1 \text{ mV}$ ). Wie eine Untersuchung zur Entwicklung der intrinsischen Eigenschaften von SOC-Neuronen der Ratte von Embryonaltag (E) 18 bis Postnataltag 17 nahelegt, scheint sich das Ruhemembranpotential dieser Zellen während der Entwicklung generell nicht zu verändern und liegt über alle untersuchten Altersstufen in einem Bereich von ca.  $-59 \text{ mV}$  (Kandler & Friauf 1995a).

Eine altersabhängige Reduzierung des Eingangswiderstandes und der passiven Membranzeitkonstante mit einer parallel dazu zunehmenden Expression spannungsabhängiger Leitfähigkeiten scheint ein, in vielen Regionen des Gehirns verbreitetes Phänomen zu sein. Es ist sowohl für verschiedene Zelltypen des Hippocampus (Jinno et al. 2003; Smith et al. 1995), des Neocortex (Kasper et al. 1994; Luhmann et al. 2000) und des Thalamus (Perez Velazquez & Carlen 1996), als auch für retinale Ganglienzellen (Robinson & Wang 1998) und Motoneurone des Rückenmarks (Perrier & Hounsgaard 2000) sowie granuläre Neurone des Cerebellums (Cathala et al. 2003) beschrieben worden. Im auditorischen System konnten drei Studien an Neuronen der LSO in der Ratte (Kandler & Friauf 1995a) und der Wüstenrennmaus (Sanes 1990, 1993)

ebenfalls eine signifikante Reduzierung dieser passiven Membraneigenschaften mit zunehmendem Alter nachweisen. Eine Reduzierung des Eingangswiderstandes und der direkt davon abhängigen Membranzeitkonstante mit zunehmendem Alter kann dabei mehrere Ursachen haben. Da der Eingangswiderstand einer idealisiert runden Zelle umgekehrt proportional zum Quadrat des Zellradius ist, wäre die einfachste Erklärung für eine Reduzierung dieser Parameter eine Zunahme der neuronalen Membranfläche. Bedenkt man allerdings die rapide (ca. 5-fache) Abnahme der Werte für Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante innerhalb der ersten zwei Tage nach Hörbeginn, dann scheint eine reine Größenzunahme als Erklärung auszuschneiden. Um diese Werte zu erreichen müssten die MSO-Neurone innerhalb dieser zwei Tage ungefähr um den Faktor fünf größer werden. Eine solche Größenzunahme der MSO-Neurone konnte weder bei während der Ableitungen gefüllten Zellen in dieser Arbeit, noch in einer Entwicklungsstudie für MSO-Neurone der Ratte (Kandler & Friauf 1995a) beobachtet werden. Zwar nimmt die Größe der Ratten-MSO-Neurone mit dem Wachstum des Gehirns zu (Kandler & Friauf 1995a), jedoch ist dieses Wachstum der Neurone bei weitem nicht stark genug, um die hier beobachtete, rapide, nichtlineare Abnahme in Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante zu erklären. Eine alternative und wahrscheinlichere Erklärung könnte in einer Abnahme des spezifischen Membranwiderstandes ( $M\Omega / \text{cm}^2$ ) liegen, welcher durch die Dichte und Kinetik von Ionenleitfähigkeiten in der Membran definiert wird. Werden nun während der Entwicklung verstärkt spannungsgesteuerte Ionenkanäle in der Membran exprimiert, welche zudem bereits um das Ruhepotential der Zellen aktiv sind, dann würde nach dem Ohmschen Gesetz durch die Aktivität dieser Ströme, bei gegebenem Ruhepotential, der spezifische Membranwiderstand und damit der Eingangswiderstand der Neurone herabgesetzt. Da die Membranzeitkonstante direkt vom Membranwiderstand und damit auch vom gemessenen Eingangswiderstand abhängt (s.h. auch Kapitel 4.4.2), müsste sie in gleicher Weise abnehmen. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die altersabhängige Expression von Ionenkanälen nicht spezifisch untersucht wurde, geben doch die I/V-Kurven der MSO-Neurone indirekte Hinweise auf eine altersabhängige Veränderung der Leitfähigkeiten für Natrium- und Kaliumionen. Wie aus diesen Kurven hervorgeht, zeigte sich ab P14 gleichzeitig zur Reduktion von Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante eine markante Nichtlinearität in der Spannungsantwort der Zellen auf depolarisierende und hyperpolarisierende Strompulse, was auf eine spannungsabhängige Aktivierung von Leitfähigkeiten für Natrium- und Kaliumionen hinweist (Manis & Marx 1991; Oertel 1983; Smith 1995).

Wie bereits erwähnt, scheint sich die Entwicklung der biophysikalischen

Membraneigenschaften nach Hörbeginn in der MSO der Wüstenrennmaus hauptsächlich innerhalb der ersten zwei Tage nach Hörbeginn zu vollziehen. Die Entwicklung fällt damit unmittelbar in die Zeitspanne, in welcher das Hörsystem der Wüstenrennmaus (Woolf & Ryan 1985) und damit auch die Nuclei des SOC's erstmals durch Luftschall stimuliert werden (LSO: Sanes & Rubel 1988; VCN: Woolf & Ryan 1985). Man könnte daher spekulieren, ob die beobachtete rapide Entwicklung der intrinsischen Eigenschaften eventuell nicht allein vom Alter und damit von stimulusunabhängigen Prozessen abhängt, sondern möglicherweise auf die Erfahrung schallinduzierter Aktivität zurückzuführen ist. Eine Einschätzung, ob eine solche spezifisch von akustischer Stimulation abhängige Expression spannungsgesteuerter Leitfähigkeiten tatsächlich in der MSO vorliegt, gestaltet sich allerdings schwierig. So liegen für die MSO keine Informationen zu den intrinsischen Eigenschaften von Zellen vor Hörbeginn und von Tieren mit manipulierter auditorischer Erfahrung vor. Zudem liegen sowohl für andere Nuclei des auditorischen Systems, als auch für andere Systeme welche eine altersabhängige Entwicklung der intrinsischen Eigenschaften zeigen (s.h. oben) keine soliden Daten vor, welche die Annahme einer Aktivitätsabhängigkeit dieser Entwicklung belegen könnten. So scheint sich beispielsweise in der LSO der Ratte eine Reduktion im Eingangswiderstand und der Membranzeitkonstante weitgehend unabhängig von auditorischer Stimulation bereits vor Hörbeginn zu entwickeln (Kandler & Friauf 1995a). Auch in der LSO der Wüstenrennmaus (Sanes 1990, 1993) scheint die Entwicklung einer Reduktion des Eingangswiderstandes ebenfalls weitgehend vor Hörbeginn stattzufinden. So zeigt Sanes (1990, 1993) eine Abnahme des mittleren Eingangswiderstandes von  $64 \pm 5$  (SD)  $M\Omega$  (P1 – P7; Sanes 1993) auf einen Wert von  $42 \pm 8,5$  (SD)  $M\Omega$  zwischen P8 und P14 (Sanes 1993), welcher sich auch in den ältesten untersuchten Tieren von P17 – P23 im Mittel nicht weiter veränderte ( $42 \pm 21$  (SD)  $M\Omega$ ; Sanes 1990). Allerdings könnte die hohe Standardabweichung der P17 – P23 Gruppe darauf hinweisen, dass sich auch nach Hörbeginn der Eingangswiderstand noch weiter reduziert haben könnte. Aufgrund der Einteilung der Altersgruppen in diesen Arbeiten (Sanes 1990, 1993) ist es jedoch schwierig, Veränderungen im Eingangswiderstand direkt mit dem Hörbeginn in Beziehung zu setzen. Ähnliches gilt auch für die Entwicklung der Membranzeitkonstante von LSO-Neuronen in der Wüstenrennmaus. Wie aus den Daten von Sanes (1990, 1993) hervorgeht, lag die Membranzeitkonstante bei LSO-Neuronen von P1 – P7 bei ca. 8,8 ms, reduzierte sich zwischen P8 und P14 auf ca. 3,8 ms und erreichte bei LSO-Neuronen von Tieren der Altersstufen P17 – P23 einen Wert von ca. 1,1 ms. Da die Abnahme in der Membranzeitkonstante von P1 bis P23 in der LSO im Unterschied zur MSO aber mehr



oder weniger linear erscheint, ist es fraglich, ob Hörerfahrung nach P12 einen entscheidenden Einfluss auf diese Entwicklung in der LSO ausübt. Aufgrund der Ergebnisse in der LSO scheint es durchaus wahrscheinlich, dass auch in der MSO bereits vor Hörbeginn eine Reduzierung von Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante stattfindet, das Ausmaß müsste allerdings erst durch weitere Experimente geklärt werden.

Trotz dieser Unsicherheiten scheint aber eine aktivitätsabhängige Reduzierung nach Hörbeginn nicht ausgeschlossen, vorallem wenn man die funktionalen Auswirkungen einer solchen Entwicklung auf das Antwortverhalten der Neurone im Zusammenhang mit der ITD-Verarbeitung berücksichtigt. Wie bereits mehrfach erwähnt, legen die Ergebnisse von *in vivo* Untersuchungen nahe, dass MSO-Neurone der Wüstenrennmaus ein phasengekoppeltes Antwortverhalten zu sinoidalen Reintönen bis zu 1800 oder 1900 Hz aufweisen (Brand et al. 2002; Spitzer & Semple 1995). Eine ganze Reihe von *in vitro* Studien an SBCs / GBCs des AVCNs (Manis & Marx 1991; Rothman & Manis 2003a,b), Octopuszellen des PVCNs (Bal & Oertel 2000, 2001; Golding et al. 1999; Oertel 1983), Zellen des MNTBs (Banks & Smith 1992; Banks et al. 1993; Brew & Forsythe 1995), sowie Zellen des Nucleus Magnocellularis (analoge Struktur zum CN der Säugetiere; Brenowitz & Trussell 2001; Rathouz & Trussell 1998; Reyes et al. 1994) und Nucleus Laminaris (Reyes et al. 1996) in Vögeln legen nun nahe, dass die massive Entwicklung von spannungsgesteuerten Leitfähigkeiten, welche zu einer markanten einwärts und auswärts gerichteten Gleichrichtung des Stroms führen, von grundlegender Bedeutung für ein zeitlich präzises Phasenkopplungsverhalten zu Reintönen ist. Bestätigt werden diese Ergebnisse durch neuronale Modelle der jeweiligen Zelltypen (Rothman & Manis 2003b,c; Rothman et al. 1993). Sie können nachweisen, dass ein auf erregenden Eingängen basierendes, zeitlich präzises phasisches Antwortverhalten dieser Neurone nur durch einwärts und auswärts gerichtete Leitfähigkeiten, die bereits um das Ruhepotential aktiv sind, erreicht werden kann. Die Aktivität dieser unterschwellig aktiven Leitfähigkeiten scheint dabei auch ursächlich zu den sehr niedrigen Eingangswiderständen dieser Neurone beizutragen (Manis & Marx 1991; Oertel 1983). Bei der Integration phasengekoppelter, erregender Eingänge führt die Aktivität dieser Leitfähigkeiten zu einem sehr schnellen Abklingen der EPSPs und zu einer Filterung kleiner, rauschhafter Signale. Damit verbessern diese Leitfähigkeiten das Signal-Rauschverhältnis und erleichtern die zeitlich präzise Summation koinzidenter, starker, erregender Ströme, welche in der Lage sind diese entgegengesetzt wirkenden Membranleckströme zu überwinden (Svirskis & Rinzel 2003). Zusätzlich scheint die, durch eine Aktivität spannungsgesteuerter Natrium- und Calciumkanäle hervorgerufene Spannungstransiente, welche bei der Injektion

depolarisierender Strompulse vor Erreichen der Aktionspotentialschwelle beobachtet werden kann, zu einer schnellen Aktivierung und Deaktivierung der Erregung beizutragen (Golding et al. 1999). Für MSO-Zellen, die in der Verarbeitung von ITDs ebenfalls über ein extrem gutes Phasenkopplungsverhalten verfügen müssen, scheint es demnach funktionell notwendig, diese Leitfähigkeiten und damit die in den Ergebnissen dieser Arbeit beschriebenen intrinsischen Membraneigenschaften zu entwickeln. Wie ein qualitativer Vergleich zu Ergebnissen von MSO-Neuronen des adulten Meerschweinchens (Smith 1995) zeigt, scheinen die in den I/V-Kurven der P15–P17 MSO-Neurone der Wüstenrennmaus festgestellten intrinsischen Eigenschaften bereits ein adultes Niveau erreicht zu haben. Wie diese adulten MSO-Neurone des Meerschweinchens (Smith 1995), zeigen die I/V-Kurven der Wüstenrennmaus MSO-Neurone ein extrem nichtlineares Antwortverhalten auf depolarisierende und hyperpolarisierende Strompulse.

Daraus könnte man folgern, dass die MSO-Neurone von Wüstenrennmäusen bereits ab ca. P15 in der Lage sein müssten eine, adulten Tieren entsprechende, Phasenkopplung zu Reintönen zu zeigen. Dies würde auch in etwa dem Zeitpunkt entsprechen, zu dem die erregenden Eingänge zu MSO-Neuronen, also die Neurone des VCN, eine adulten Wüstenrennmäusen entsprechende Phasenkopplung zu tieffrequenten Reintönen zeigen (ca. P16; Woolf & Ryan 1985). Obwohl bisher keine direkten *in vivo* elektrophysiologischen Daten zum Phasenkopplungsverhalten und zur ITD-Sensitivität der MSO-Neurone dieser Altersstufen existieren, so findet diese Hypothese doch eine indirekte Bestätigung durch *in vivo* Untersuchungen von Neuronen des DNLL zwischen P15 – P16 (Seidl & Grothe 2003). Die DNLL-Neurone, welche direkte erregende Eingänge aus der MSO erhalten (Glendenning et al. 1981; Henkel 1997; Kollmar 2003; Shneiderman et al. 1988), zeigen dabei in diesen Altersstufen einerseits bereits eine Phasenkopplung und andererseits eine ITD-Sensitivität wie sie in adulten Tieren unter pharmakologischer Blockade der glycinergen Inhibition (Brand et al. 2002) zu finden ist, also mit einer „besten ITD“ nahe Null und nur einem geringen Anteil des dynamischen Bereiches der ITD-Funktionen im verhaltensrelevanten Bereich von ITDs (Seidl & Grothe 2003; s.h. auch Kapitel 5.2.4). Da die DNLL-Neurone in ihrem Antwortverhalten den MSO-Eingang widerspiegeln sollten (Kuwada et al. 1997), könnte man annehmen, dass eine Koinzidenzdetektion erregender Eingänge und damit auch eine genaue Phasenkopplung zu diesen Eingängen bereits ungefähr zum Postnataltag 15 in MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus etabliert sein könnte. Eine solche Entwicklung des auf erregenden Eingängen basierenden Phasenkopplungsverhaltens der MSO-Neurone würde auch gut zu den in Kapitel 5.3.2 diskutierten Aspekten des Mechanismus für die anatomische

Entwicklung inhibitorischer Eingänge passen. Wenn man annimmt, dass der hypothetische STDP-Mechanismus auf einer zeitlich genauen Abstimmung der Aktivität präsynaptischer inhibitorischer Eingänge und dem Aktionspotential der postsynaptischen Zelle beruht, dann wäre es höchstwahrscheinlich günstig in der postsynaptischen Zelle eine phasengekoppelte Aktivität, bedingt durch die erregenden Eingänge, als eine Art Grundzustand des Systems zu etablieren. Die, durch eine Koinzidenz erregender Eingänge vorgegebene ITD-Sensitivität könnte damit gleichsam als ein Substrat dienen, welches den Zeitrahmen für eine Interaktion mit der Hemmung vorgibt. Ausgehend von diesem Grundzustand des Systems könnte sich dann die räumliche Begrenzung der glycinergen Eingänge und damit die in adulten Wüstenrennmäusen erkennbare, von der Hemmung geformte, ITD-Sensitivität entwickeln. Eine zeitliche Trennung in eine frühe Entwicklung intrinsischer Membraneigenschaften, die eine auf erregenden Eingängen basierende, exakte Phasenkopplung ermöglichen und einer späteren, darauf aufbauenden Entwicklung einer zeitlich genau abgestimmten Inhibition wäre damit möglicherweise ein sinnvoller und gangbarer Weg einen STDP-Mechanismus in MSO-Zellen zu etablieren.

Aussagen über die Art der Leitfähigkeiten, welche der einwärts und auswärts gerichteten Gleichrichtung des Stroms bei MSO-Zellen zwischen P15 und P17 zugrundeliegen, sind aufgrund der vorliegenden Daten nur schwer möglich. Um die genauen Typen von Ionenkanälen zu bestimmen, hätten weitere Experimente mit spezifischen Ionenkanal-Antagonisten sowohl im CC-Modus als auch im VC-Modus durchgeführt werden müssen. Diese Messungen sind allerdings sehr aufwendig und würden für sich selbst eine eigene Studie darstellen. Allerdings könnte die Natur dieser Leitfähigkeiten durch einen Vergleich der MSO-Daten dieser Arbeit mit Daten von SBCs / GBCs des AVCNs und Octopuszellen des PVCNs eingegrenzt werden. Speziell ein Vergleich mit Octopuszellen scheint sich dabei aus mehreren Gründen anzubieten. So zeigen Octopuszellen einerseits ebenfalls eine zeitlich präzise Phasenkopplung zu Reintönen bis ca. 800 Hz (Friauf & Ostwald 1988; Godfrey et al. 1975; Rhode & Smith 1986; Rhode et al. 1983a), andererseits sind die im CC-Modus gemessenen intrinsischen Eigenschaften von Octopuszellen der adulten Maus (Bal & Oertel 2000, 2001; Golding et al. 1999) nahezu identisch zu den hier festgestellten Eigenschaften in der MSO der Wüstenrennmaus (P15 – P17). Auf depolarisierende Strompulse antworten Octopuszellen ebenfalls phasisch mit nur einem kleinen, sehr kurzen Aktionspotential (Amplitude:  $15,5 \pm 6,9$  (SD) mV; Dauer:  $0,3 \pm 0,1$  (SD) ms; Golding et al. 1999) am Beginn des Stimulus. Der Eingangswiderstand ist ebenfalls sehr niedrig ( $2,4 \pm 0,9$  (SD) M $\Omega$ ; Golding et al. 1999) und die Membranzeitkonstante ist sehr kurz ( $0,21 \pm 0,06$  (SD) ms;

Golding et al. 1999). Wie pharmakologische Untersuchungen im CC- und VC-Modus an Octopuszellen nachweisen können, liegt der auswärts gerichteten Gleichrichtung des Stroms (OWR) eine Dendrotoxin sensitive Kaliumleitfähigkeit mit einer niedrigen Aktivierungsschwelle zugrunde ( $I_{KLT}$ ; Bal & Oertel 2001; Golding et al. 1999). Der  $I_{KLT}$  – Strom ist dabei über den gesamten Bereich an physiologischen Membranpotentialen der Octopuszellen aktiv, und zeigt dabei bereits bei Membranpotentialen niedriger als -45 mV, also auch um das Ruhepotential der Zellen (ca. -62 mV; Golding et al. 1995, 1999), eine deutliche Aktivierung (Bal & Oertel 2001). Ein ähnliches Verhalten von  $I_{KLT}$  wurde auch für SBCs / GBCs des AVCNs (Manis & Marx 1991; Rothman & Manis 2003a,b,c) und für Neurone des Nucleus Magnocellularis (Rathouz & Trussell 1998; Reyes et al. 1994) sowie Neurone des MNTB (Banks & Smith 1992; Wu & Kelly 1991) beschrieben. Diese  $I_{KLT}$  – Leitfähigkeit ist dabei höchstwahrscheinlich auf Kaliumkanäle des Kv1-Typs zurückzuführen (Bal & Oertel 2001; Golding et al. 1999; Grissmer et al. 1994; Hopkins et al. 1994; Stuhmer et al. 1989). Dies stimmt auch mit Ergebnissen zum Phasenkopplungsverhalten von MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus überein, die eine Dendrotoxin sensitive  $I_{KLT}$  – Leitfähigkeit nachweisen (Svirskis et al. 2002). Welche Typen von Kv1-Kanälen in der MSO der Wüsterenmaus exprimiert werden ist zur Zeit nicht bekannt, hierzu könnten immunhistochemische Untersuchungen weiteren Aufschluss bringen.

Die markante einwärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms (IWR) kann dagegen mit sehr hoher Sicherheit der Aktivität der gemischten Kalium- / Natriumionen Leitfähigkeit  $I_h$  zugeschrieben werden. Dieser, durch zunehmende Hyperpolarisation immer stärker aktivierte Strom zeigt in Octopuszellen ein Umkehrpotential zwischen -33 – -48 mV, wobei keine spannungsabhängige Inaktivierung feststellbar ist (Bal & Oertel 2000). Wie  $I_{KLT}$ , so scheint auch der  $I_h$  – Strom ein integraler Bestandteil der biophysikalischen Membraneigenschaften zeitverarbeitender Neurone des auditorischen Systems zu sein. So konnte ein signifikanter  $I_h$  – Strom bisher neben Octopuszellen auch in SBCs / GBCs des AVCNs (Cuttle et al. 2001), in Neuronen des MNTBs (Banks et al. 1993; Cuttle et al. 2001), der LSO (Kandler & Friauf 1995a), des VNLLs (Zhao & Wu 2001) und DNLLs (Fu et al. 1997) sowie in Neuronen des ICs (Koch & Grothe 2003) nachgewiesen werden. Da auch MSO-Neurone des adulten Meerschweinchens (Smith 1995) diesen  $I_h$  – Strom zeigen, kann man mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgehen, dass die in MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus beobachtete einwärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms ebenfalls auf  $I_h$  beruht. Was die Expression der, dem  $I_h$  – Strom zugrundeliegenden HCN-Kanäle (Ludwig et al. 1998;

Santoro et al. 1998; Seifert et al. 1999; s.h. auch die Übersichtsartikel Ludwig et al. 1999; Santoro & Tibbs 1999) in der MSO der Wüstenrennmaus betrifft, so liegen auch dafür im Moment noch keine Daten vor. Wie allerdings eine immunhistochemische Untersuchung des Expressionsmusters von HCN1 und HCN2 im auditorischen Stamm- und Mittelhirn der Ratte nahelegt, scheinen beide Kanäle in der MSO der Ratte nachweisbar (U. Koch unpublizierte Ergebnisse). Obwohl dies erst explizit nachgewiesen werden müsste, so wäre es doch möglich, dass beide Kanäle auch in der MSO der Wüstenrennmaus die Basis für den  $I_h$  – Strom bilden.

Wie aus allen vorher genannten Arbeiten hervorgeht, scheint  $I_h$  wie auch  $I_{KLT}$  bereits am Ruhepotential der Zellen deutlich aktiviert zu sein. Die Aktivität beider Leitfähigkeiten zusammen scheint daher zu dem sehr niedrigen Eingangswiderstand der Zellen zu führen. Obwohl beide Leitfähigkeiten im Prinzip einander entgegenwirken, so sollte doch die Interaktion beider nicht nur das Ruhemembranpotential der Neurone definieren, sondern vor allem auch deutlichen Einfluss auf die Integration synaptischer Antworten haben. Während  $I_{KLT}$  zu einer zeitlichen Verkürzung von EPSPs beitragen sollte und damit das Phasenkopplungsverhalten der Zellen verbessern müsste (s.h. oben), könnte  $I_h$  zu einer signifikanten Verkürzung synaptisch evozierter IPSPs führen. Damit könnte der  $I_h$  – Strom zusätzlich zur räumlichen Beschränkung der glycinergen Eingänge in der MSO der Wüstenrennmaus zu einer Verringerung von zeitlicher und räumlicher Summation der inhibitorischen Eingänge beitragen (Cuttle et al. 2001; Koch & Grothe 2003; Magee 1998, 1999), was spezifisch die Zeitauflösung der Inhibition bei der ITD-Verarbeitung weiter verbessern würde.

#### **5.4.2 Entwicklung des Zeitverhaltens glycinерger Synapsen bei MSO-Neuronen**

Wie die Ergebnisse darlegen, war in der elektrophysiologischen Entwicklung glycinерger Synapsen zu MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus innerhalb von zwei bis fünf Tagen nach Hörbeginn (P14 – P17) trotz einer von Zelle zu Zelle erkennbaren Variabilität ein Trend hin zu einer schnelleren Kinetik der IPSPs und IPSCs mit zunehmendem Alter der Tiere zu beobachten. Zudem ergaben sich in den kinetischen Eigenschaften von P17-IPSCs erste Hinweise auf Zeitkonstanten im Bereich von hunderten von  $\mu$ s.

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln zur anatomischen Entwicklung räumlich beschränkter glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus ausführlich diskutiert, könnte diese räumliche Anordnung bei adulten MSO-Zellen dazu beitragen, die in der ITD-Verarbeitung funktionell notwendige, schnelle

Kinetik der IPSPs und IPSCs zu erreichen (s.h. Kapitel 5.2.4). Aus verschiedenen technischen Gründen war eine Untersuchung der kinetischen Eigenschaften von IPSPs und IPSCs bei adulten MSO-Zellen allerdings nicht möglich (s.h. Kapitel 5.1.2). Trotzdem sollte sich in den Altersstufen die einer *in vitro* Untersuchung zugänglich waren, eine zur erfahrungsabhängigen Entwicklung der räumlichen Differenzierung parallele Entwicklung der synaptischen Eigenschaften zeigen. Wie die in einigen Punkten noch vorläufige Untersuchung der kinetischen Eigenschaften von IPSPs und IPSCs an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus zeigen kann, war dies tatsächlich zumindest tendenziell der Fall.

Aus dem Zusammenhang zwischen der Funktion der MSO-Zellen in adulten Tieren und der Entwicklung der kinetischen Eigenschaften von IPSPs und IPSCs erschließt sich auch die Auswahl der untersuchten Altersstufen (P14 – P17). Postnataltag 14 als Beginn der Untersuchung wurde bewusst gewählt, da zum einen die Entwicklung der intrinsischen Eigenschaften weitgehend abgeschlossen erschien (s.h. Kapitel 5.4.1) und zum anderen mehrere Studien an MNTB-Zellen nahelegen, dass die MNTB-Neurone am Postnataltag 14 eine weitgehend ausgereifte Anatomie und Physiologie zeigen. So weist die, mit dem Aktivitätsmarker c-fos bestimmte tonotope Karte des MNTB in der Ratte bereits eine adulten Tieren entsprechende Frequenzverteilung auf (Friauf 1992), auch die Morphologie der Calyxsynapsen entspricht bereits der von adulten Ratten (Kandler & Friauf 1993). Ferner scheint zu diesem Zeitpunkt, neben der Entwicklung einer adult-ähnlichen Expression von präsynaptischen Calciumkanälen (Iwasaki & Takahashi 1998), calziumbindenden Proteinen (Lohmann & Friauf 1996), sowie metabotropen (Elezgarai et al. 1999) und ionotropen Glutamatrezeptoren (Caicedo & Eybalin 1999) auch die Entwicklung der intrinsischen Membraneigenschaften (Cuttle et al. 2001) abgeschlossen zu sein. Zudem zeigen die Ergebnisse von *in vitro* elektrophysiologischen Arbeiten, dass sich zwischen P14 in der Ratte (Chuhma & Ohmori 1998; Taschenberger & von Gersdorff 2000) und P16 in der Maus (Futai et al. 2001) eine zeitlich äußerst präzise synaptische Übertragung zwischen der Calyxsynapse und der MNTB-Zelle etabliert. Dieser Zeitpunkt der Reifung von MNTB-Neuronen deckt sich zudem mit dem Zeitpunkt der vollständigen Reifung der cochleären Eigenschaften (Finck et al. 1972; Woolf & Ryan 1984, 1985) und des Antwortverhaltens von VCN-Neuronen (P14 – P16, Woolf & Ryan 1985) in der Wüstenrennmaus. Daraus könnte man ableiten, dass die MNTB-Zellen schon an P14 *in vivo* in der Lage sein müssten ein zeitlich präzises Phasenkopplungsverhalten zu zeigen. Die GBC – MNTB – Projektion müsste daher soweit ausgereift sein, um durch die Axone der MNTB-Zellen eine zeitlich präzise Inhibition an die Neurone der MSO weiterzugeben. Aus diesen Gründen dürfte es sinnvoll erscheinen P14 als Beginn der Untersuchung zu

wählen, denn mögliche Veränderungen in der Kinetik der Inhibition mit zunehmendem Alter dürften dann vorallem auf direkte Effekte an der Synapse zu MSO-Neuronen zurückzuführen sein. Mögliche Ursachen dieser Veränderungen wären dann höchstwahrscheinlich in der räumlichen Verteilung der Synapsen oder eventuell in spezifischen Anpassungen der präsynaptischen Vesikelausschüttung oder der postsynaptischen Glycinrezeptoren zu finden. Während sich das Alter der Tiere für den Beginn der Untersuchung aus Überlegungen zur Entwicklung der Eingänge und der intrinsischen Eigenschaften der MSO-Neurone ergab, setzten technische Limitationen den Endpunkt am Postnataltag 17 fest. Wie bereits in den Überlegungen zu den verwendeten Methoden (Kapitel 5.1.2) diskutiert, konnten nur bis zu einem Alter von P17 aussagefähige Ergebnisse erzielt werden. Für die Interpretation der Ergebnisse zur Entwicklung der kinetischen Eigenschaften wäre es sicher wünschenswert gewesen, wenn bis zu einem Alter von P21 Daten vorliegen würden, da anatomisch bei P17 die Entwicklung der räumlichen Beschränkung der glycinergen Synapsen noch nicht beendet war (Ehrhardt 2000).

Die Ergebnisse zur kinetischen Entwicklung der IPSPs zeigen sowohl in der HMB, als auch in der 10 – 90% Anstiegszeit von P14 – P17 einen Trend zu einer zeitlichen Verkürzung beider Parameter und damit zu einer Beschleunigung der IPSPs. Dieses Ergebnis hat allerdings aufgrund der wenigen untersuchten Zellen nur vorläufigen Charakter. Hier müsste durch weitere Experimente eine breitere Datenbasis geschaffen werden, welche es ermöglichen könnte definitive Aussagen zur Entwicklung der IPSPs zu machen. Trotz der Vorläufigkeit der Ergebnisse, sind doch die mit einer Dauer von 2,41 ms und 3,84 ms bereits vergleichsweise kurzen IPSPs am Postnataltag 17 auffällig. So zeigen beispielsweise IPSPs bei LSO-Neuronen der Wüstenrennmaus von P17 – P23 eine Dauer von ca. 3.2 ms – 8,1 ms (Sanes 1990) und IPSPs bei VCN-Neuronen der Maus (P14 – P28) eine Dauer von ca. 4 ms – 10 ms (Oertel 1983). Abgesehen von der kurzen Dauer zeigten die IPSPs beider P17-Zellen dabei eine außergewöhnlich schnelle Anstiegszeit von 0,57 ms bzw. 0,67 ms. Im Vergleich zu glycinergen und GABAergen Synapsen anderer Systeme zeigt sich die besondere Schnelligkeit dieser Potentiale in der MSO noch deutlicher. So weisen glycinerge IPSPs an Motoneuronen des Rückenmarks nur eine Anstiegszeit von ca. 1,8 ms (Singer et al. 1998) und GABAerge IPSPs an Pyramidenzellen des Hippocampus (Buhl et al. 1995) und visuellen Cortex (Tamas et al. 1997) nur eine Dauer / Anstiegszeit von ca. 31,6 ms / 4,6 ms (Buhl et al. 1995) bzw. 15,82 ms / 2,59 ms (Tamas et al. 1997) auf.

Die Entwicklung der kinetischen Eigenschaften von glycinergen IPSCs an MSO-

Neuronen der Wüstenrennmaus zeigte ebenfalls von P14 – P17 eine Tendenz zu schnelleren IPSCs mit zunehmendem Alter. Allerdings war diese in den Kinetikparametern  $\tau_{\text{dec}}$  und 10 – 90% Anstiegszeit ausgedrückte Tendenz, bedingt durch eine hohe Variabilität zwischen den untersuchten Zellen, nur in einem Teil der P17-Neurone klar zu erkennen. Diese P17-Zellen zeigten aber mit einem  $\tau_{\text{dec}}$  von 0,54 ms – 1,26 ms und einer Anstiegszeit von 0,19 ms – 0,25 ms bereits außergewöhnlich schnelle IPSCs. Die hohe Variabilität innerhalb der P14- und P17-Zellen könnte eventuell zum Teil damit erklärt werden, dass die Tiere trotz vordergründig gleichen postnatalen Alters unterschiedlich weit entwickelt waren. Eine unterschiedliche Entwicklung kann dabei mehrere Ursachen haben. Durch unterschiedliche Wurfgrößen könnten sich Tiere eventuell verschieden schnell entwickeln, so waren Tiere aus kleinen Würfen durchgehend schwerer als solche aus großen Würfen (C. Kapfer pers. Beobachtung). Tiere mit niedrigerem Gewicht als der Altersdurchschnitt könnten so möglicherweise auch in der neuronalen Entwicklung nicht ganz dem Altersdurchschnitt entsprechen. Auch ist eine generelle Schwankungsbreite im Fortgang einer Entwicklung von Tier zu Tier nicht auszuschließen, besonders wenn Entwicklungsprozesse während ihres Ablaufs beobachtet werden. Auch die Definition des Tages der Geburt eines Tieres kann zu der Variabilität beigetragen haben. Durch die nur ein Mal tägliche Kontrolle der Brutkolonie, würden auch kurz nach diesem Zeitpunkt geborene Tiere erst am nächsten Tag aufgefunden, damit ist dieser Tag dann der Geburtstag. Dies hat zur Folge, dass diese Tiere als einen Tag jünger eingestuft werden, als dies tatsächlich der Fall ist. Wenn man sich vor Augen hält, dass in der Arbeit Entwicklungsprozesse untersucht wurden, welche innerhalb nur weniger Tage vor sich gehen, dann kann eine einen Tag längere Entwicklung möglicherweise bereits eine deutliche Veränderung der anatomischen und physiologischen Eigenschaften bedeuten. In weiteren Experimenten, welche aufgrund der eher niedrigen Anzahl an Zellen zur Beschreibung der Entwicklung noch notwendig sind, sollte daher speziell auf eine möglichst uniforme Population an Tieren einer Altersstufe geachtet werden. Spezifisch bei Tieren an P17 kommt noch eine weitere Erklärung für die beobachtete Variabilität in Betracht. Wie bereits erwähnt, zeigt sich anatomisch erstmals an P17 eine erkennbare räumliche Begrenzung der glycinergen Synapsen auf die Somaregion (Ehrhardt 2000). Wenn nun die räumliche Begrenzung der glycinergen Synapsen einer Beschleunigung der IPSCs zugrundeliegt, dann könnte sich die Variabilität in der Kinetik der P17-IPSCs mit einer unterschiedlich weit fortgeschrittenen Entwicklung der räumlichen Verteilung der glycinergen Synapsen erklären lassen. Die Zellen mit der schnellsten Kinetik in der untersuchten Population weisen möglicherweise bereits auf die Somaregion der MSO-



Neurone begrenzte glycinerge Synapsen auf, während diese Entwicklung an Zellen mit langsamerer Kinetik noch nicht so weit fortgeschritten ist. Möglicherweise verteilen sich die Synapsen bei diesen Zellen noch relativ homogen über die Somata und Dendriten, wie dies bei jungen Tieren dieser Arbeit und bei P14-Tieren (Ehrhardt 2000) zu finden war. Es wäre daher nicht weiter verwunderlich, wenn die IPSCs dieser Zellen eine den P14-IPSCs entsprechende Kinetik aufweisen würden. Um Klarheit über den Zusammenhang zwischen der anatomischen Verteilung und den kinetischen Eigenschaften der P17-IPSCs zu erhalten, müsste daher, in weiteren Experimenten, an den abgeleiteten MSO-Neuronen eine immunhistochemische Untersuchung der Verteilung glycinerges Synapsen durchgeführt werden. Durch das Markieren der Zelle mit Neurobiotin während der Ableitung, kann die untersuchte Zelle später im Hirnschnitt auch zweifelsfrei wiedergefunden werden und die Synapsenverteilung an dieser individuellen Zelle kann bestimmt werden.

Aus dem möglichen Zusammenhang zwischen der Entwicklung einer räumlichen Beschränkung der glycinergen Synapsen und der Entwicklung einer sehr schnellen Kinetik der IPSCs von MSO-Neuronen würde man erwarten, eine ähnlich schnelle IPSC-Kinetik nicht bei MSO-Neuronen der Ratte zu finden, welche keine räumliche Beschränkung glycinerges Synapsen zeigen. Diese Frage lässt sich allerdings aus den Daten der einzigen Studie an MSO-Neuronen der Ratte (Smith et al. 2000) nicht beantworten, da in dieser Studie nur Ratten bis zum Postnataltag 14 untersucht wurden. Aber schon ein Vergleich der IPSC-Kinetik der P14-IPSCs dieser Arbeit zu den Daten von P14-Ratten-MSO-Neuronen zeigt eine leicht schnellere IPSC-Kinetik bei MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus. Während die P14-IPSCs der Wüstenrennmaus-MSO-Neurone ein mittleres  $\tau_{\text{dec}}$  von ca. 2,8 ms ( $n = 7$ ) zeigten, weisen die IPSCs der drei von Smith et al. (2000) untersuchten P14-Ratten-MSO-Neurone im Durchschnitt eine Kinetik im Bereich eines  $\tau_{\text{dec}}$  von ca. 4,8 ms auf (berechnet nach dem  $Q_{10}$ -Wert der Temperaturabhängigkeit aus Smith et al. (2000) für eine Temperatur von 32°C wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde). In ihrer Anstiegszeit liegen die IPSCs beider Spezies dagegen auf gleichem Niveau bei ca. 0,7 ms (Smith et al. 2000). Da in der mittleren Anstiegszeit keine Unterschiede feststellbar sind und bei den P14-Wüstenrennmaus-MSO-Neuronen ebenfalls eine gewisse Streuung der Einzelwerte zwischen den Zellen feststellbar war, bleibt offen, ob zwischen beiden Spezies schon an P14 Unterschiede in der IPSC-Kinetik vorliegen. Möglicherweise entstehen die Unterschiede im  $\tau_{\text{dec}}$  auch durch die geringe Datenbasis für P14-MSO-Zellen bei Ratten. Aufgrund der in beiden Spezies an P14 homogen verteilten Glycinrezeptoren wäre es wahrscheinlich, dass sie ähnliche kinetische Eigenschaften aufweisen. Um den Zusammenhang zwischen der anatomischen räumlichen

Differenzierung der glycinergen Synapsen und der kinetischen Eigenschaften der IPSCs weiter zu stärken, wäre es sicher wichtig, die Ratten-MSO als vergleichendes System zur MSO der Wüstenrennmaus zu etablieren und auch dort die Entwicklung in älteren Tieren zu untersuchen. Folgt man der Hypothese dieses Zusammenhanges, würde man in der MSO der Ratte keine weitere Beschleunigung der IPSCs mit zunehmendem Alter von P14 bis beispielsweise P17 erwarten. Weitere, vergleichende *in vitro* Experimente könnten hier Aufschluss bringen.

Ein interessanter Aspekt der Studie an der Ratten-MSO (Smith et al. 2000) ist die dort festgestellte Abhängigkeit der IPSC-Kinetik von der Temperatur während der Ableitung der Zellen. Wie sie zeigen können, ist mit steigender Temperatur eine Beschleunigung der IPSC-Kinetik zu beobachten. Das schnellste P14-IPSC der Ratten-MSO lag dabei bei 37°C bei einem  $\tau_{\text{dec}}$  von 2,0 ms im Gegensatz zu 2,5 ms (32°C) und 8,5 ms (22°C). Eine solche Temperaturabhängigkeit der Kinetik ist auch für EPSPs an Pyramidenzellen des Neocortex beschrieben worden (Volgushev et al. 2000). Für die schnellsten in der MSO der Wüstenrennmaus bei 32°C bestimmten P17-IPSCs würde eine solche Abhängigkeit bedeuten, dass sie unter physiologischer Temperatur *in vivo* sogar eine nochmals schnellere Kinetik unterhalb eines  $\tau_{\text{dec}}$  von 500  $\mu\text{s}$  zeigen müssten. Eine solch außergewöhnlich schnelle Kinetik evozierter IPSCs ist bisher weder für glycinerge noch für GABAerge Synapsen in keinem neuronalen System beschrieben worden. So zeigen die schnellsten, bisher bekannten IPSCs bei 37°C in Motoneuronen des Rückenmarks der adulten Katze nur ein  $\tau_{\text{dec}}$  von ca. 1,5 ms (Stuart & Redman 1990). Die Kinetik der meisten anderen publizierten glycinergen und GABAergen IPSCs ist dagegen schwer einzuschätzen, da sie unter verschiedensten Temperaturbedingungen und in verschiedensten Altersstufen gemessen wurden. Gemeinsam ist jedoch allen eine deutlich langsamere Kinetik, welche oftmals nicht einmal die hier gemessenen Werte an P14 erreicht. So zeigen beispielsweise evozierte glycinerge IPSCs bei hypoglossalen Motoneuronen des Rückenmarks von P10 – P18 Ratten minimal  $\tau_{\text{dec}}$ -Werte von ca. 5,5 ms und eine Anstiegszeit von ca. 1,1 ms bei Raumtemperatur (Singer et al. 1998), glycinerge IPSCs an Mauthnerzellen des adulten Zebrafisches zeigen mit einem minimalen  $\tau_{\text{dec}}$  von ca. 5 ms ähnliche Werte (Legendre 1998). Auch GABAerge IPSCs an Pyramidenzellen der CA1-Region des Hippocampus von P17-Ratten ( $\tau_{\text{dec}}$  ca. 11 – 21 ms / Anstiegszeit ca. 0,8 – 6,2 ms; Maccaferri et al. 2000), an Golgizellen des Cerebellums von P21-Ratten ( $\tau_{\text{dec}}$  ca. 14 – 16 ms; Dumoulin et al. 2001) und Neuronen des laterodorsalen Thalamus von P30-Ratten ( $\tau_{\text{dec}}$  ca. 16 ms / Anstiegszeit ca. 2,3 ms; Okada et al. 2000) zeigen deutlich langsamere kinetische Eigenschaften. Lediglich für erregende Synapsen und damit EPSCs

konnte bisher beispielsweise in P14-MNTB-Zellen der Ratte (Taschenberger & von Gersdorff 2000) und in granulären Zellen des Cerebellums der adulten Maus (Cathala et al. 2003) eine vergleichbare Kinetik mit  $\tau_{\text{dec}}$ -Werten im Bereich hunderter  $\mu\text{s}$  und Anstiegszeiten unter 200  $\mu\text{s}$  festgestellt werden. Allerdings kann die Beschleunigung dieser EPSCs im Unterschied zu den IPSCs an MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus nicht ursächlich auf eine spezifische räumliche Verteilung der Eingänge zurückgeführt werden, hier scheinen vor allem Mechanismen, welche die Kinetik einzelner Transmitterquanten bestimmen, zugrundezuliegen (Cathala et al. 2003; Taschenberger & von Gersdorff 2000).

Neben der räumlichen Beschränkung der glycinergen Synapsen könnten auch Entwicklungen der präsynaptischen Vesikelausschüttung oder der postsynaptischen Glycinrezeptoren der beobachteten schnellen Kinetik von IPSCs zugrundeliegen. So kann die Kinetik einzelner sog. mIPSCs (IPSCs die spontan durch die Ausschüttung eines Transmittervesikels entstehen) durch die Entwicklung einer synchronen Transmitterausschüttung einzelner Quanta beschleunigt werden (Diamond & Jahr 1995; Isaacson & Walmsley 1995). Eine solche Verbesserung der Synchronizität der Transmitterausschüttung würde dabei vor allem die Anstiegszeit der IPSCs beschleunigen (Diamond & Jahr 1995; Wall et al. 2002). Allerdings ist ein solcher Mechanismus untauglich die deutliche Beschleunigung im  $\tau_{\text{dec}}$  zu erklären (Cathala et al. 2003; Wall et al. 2002). Ob ein solcher Mechanismus ebenfalls in der Entwicklung einer schnelleren Anstiegszeit der IPSCs zu MSO-Neuronen eine Rolle spielt, kann aus den vorliegenden Daten nicht abschließend geklärt werden. Hierzu sind weitere Experimente notwendig, die spezifisch das zeitliche Verhalten der mIPSCs in den entsprechenden Altersstufen untersuchen und mit der Entwicklung evozierter IPSCs vergleichen. Eine weitere Möglichkeit die kinetischen Eigenschaften glycinerg IPSCs zu verändern, besteht in einer selektiven Modulation von postsynaptischen Glycinrezeptoren, bzw. deren Untereinheiten (s.h. die Übersichtsartikel Laube et al. 2002; Legendre 2001). Als Modulatoren kommen dabei beispielsweise Schwermetallionen wie Zink (Hosie et al. 2003; Laube 2002; Suwa et al. 2001) oder die  $\beta\gamma$ -Untereinheit von G-Proteinen (Yevenes et al. 2003) in Frage. Auch Proteinkinasen, wie beispielsweise PKA, PKC und CaMKII, können durch eine Phosphorylierung der Rezeptoruntereinheiten das Verhalten der Glycinrezeptoren verändern (Gentet & Clements 2002; Ruiz-Gomez et al. 1991; Song & Huang 1990; Wang & Randic 1996; Xu et al. 1999, 2000). Die Effekte dieser Modulatoren auf die Funktion und Kinetik von Glycinrezeptoren sind allerdings nur schwer im Zusammenhang mit den vorliegenden IPSCs bei MSO-Neuronen zu beurteilen, da die verschiedenen Studien meist an Zellkulturen junger Zellen oder in künstlichen

Expressionssystemen durchgeführt wurden. Ihre Effekte auf ältere Neurone in intakten Hirnschnitten sind dagegen nicht untersucht. Zudem scheint allen Modulatoren gemeinsam, dass sie zwar die Amplitude der IPSCs erhöhen und damit eine stärkere Wirkung glycinерger Inhibition erzielen, die Kinetik der IPSCs scheint sich jedoch im selben Maße zu verlangsamen (Laube 2002; Suwa et al. 2001; s.h. auch den Übersichtsartikel Legendre 2001). Es erscheint daher eher unwahrscheinlich, dass diese Modulatoren zu der beobachteten schnellen Kinetik der P17-IPSCs in der MSO der Wüstenrennmaus beitragen. Gleichwohl könnten sie andere, noch zu untersuchende Effekte auf die Funktion der Glycinrezeptoren in der MSO haben. Dies müsste aber ebenfalls durch weitere Experimente geklärt werden. Abgesehen von diesen Modulatoren könnte man auch über eine spezielle Kombination von Glycinrezeptoruntereinheiten an MSO-Neuronen spekulieren. Da beispielsweise der Übergang von homomeren  $\alpha 2$ -Glycinrezeptoren zum adulten  $\alpha 1/\beta$ -Typ mit einer deutlichen Beschleunigung der Kinetik verbunden ist (Singer et al. 1998; Smith et al. 2000; Takahashi et al. 1992), könnte es ebenso möglich sein, dass eine noch unbekannte neue oder eventuell in ihrer Struktur veränderte  $\alpha$ -Untereinheit in älteren Tieren zu einer weiteren Beschleunigung der Kinetik von Glycinrezeptoren beiträgt. Diese Annahme ist allerdings im Moment rein spekulativ und müsste erst durch eine Reihe von biochemischen Studien untersucht werden.

Im Zusammenhang mit der Funktion glycinерger Inhibition bei der ITD-Verarbeitung in der MSO der Wüstenrennmaus können die schnellsten IPSCs von P17-Neuronen eindrucksvoll die, durch das neuronale Modell (Brand et al. 2002) geforderten Zeitkonstanten inhibitorischer Ströme bestätigen. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass die, durch das Modell zur Erklärung der Rolle der Inhibition bei der initialen Verarbeitung von ITDs in der MSO geforderten Zeitkonstanten, tatsächlich zellulär in adulten MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus vorliegen können. Womit der von Brand et al. (2000) entwickelte Mechanismus der ITD-Verarbeitung in der MSO eine weitere Stärkung erfährt. Offen bleibt allerdings noch, wie die langsameren Zeitkonstanten der IPSPs dazu in Beziehung stehen. Da die Kinetik der IPSPs eher der *in vivo* vorliegenden Kinetik der Inhibition entsprechen dürfte, stellt sich die Frage, wie diese langsamere Inhibition in den Mechanismus der ITD-Verarbeitung passen könnte. Höchstwahrscheinlich beruht die langsamere Kinetik der IPSPs dabei auf der Aktivität der intrinsischen Leitfähigkeiten, vorallem der des  $I_h$  – Stroms. Durch die langsamen Zeitkonstanten der Aktivierung und Deaktivierung dieser Leitfähigkeiten (ca. 30 – 200 ms; Koch & Grothe 2003) würde dabei vorallem die abfallende Flanke des IPSPs verlangsamt, während die Anstiegsflanke der IPSPs nur wenig dadurch verändert würde. Ein solcher

Zusammenhang könnte auch aus den Daten abgelesen werden. Während die P17-IPSPs eine schnelle Anstiegszeit (0,57 ms / 0,67 ms) aufweisen, ist die HMB, welche hauptsächlich durch die abfallende Flanke definiert wird, eher langsam (2,41 ms / 3,84 ms). Es wäre daher vorstellbar, dass die schnelle Kinetik des IPSCs vor allem den Beginn und damit die Anstiegsflanke des IPSPs bestimmt, während die etwas später aktivierten intrinsischen Leitfähigkeiten den Abfall des Potentials bestimmen. Damit würde eine direkte Abhängigkeit zwischen den biophysikalischen Membraneigenschaften und der Kinetik der IPSPs herrschen. Eine solche Abhängigkeit konnte schon für IPSPs an Neuronen der LSO (Kandler & Friauf 1995a,b) und Motoneuronen des Rückenmarks (Singer et al. 1998), sowie für EPSPs an der neuromuskulären Synapse (Jaramillo et al. 1988) nachgewiesen werden. Um nun die IPSPs möglichst kurz zu halten, bräuchte es zwei Voraussetzungen. Zum einen müssen die IPSCs sehr schnell sein um die intrinsischen Leitfähigkeiten nur kurz zu aktivieren, zum anderen müssen die intrinsischen Membraneigenschaften ebenfalls kurze Zeitkonstanten aufweisen. Beides scheint in den MSO-Neuronen vorzuliegen. Durch die sehr schnellen IPSCs würde die Aktivierung der Leitfähigkeiten minimiert und durch die gegenläufige Wirkung von  $I_{KLT}$  und  $I_h$ , welche sich in der sehr schnellen Membranzeitkonstante ausdrückt, könnte die Wirkung dieser Leitfähigkeiten entscheidend verkürzt werden. Wie ein neuronales Modell zur Wirkung dieser Leitfähigkeiten bei der Phasenkopplung erregender Eingänge in der MSO vorschlägt, könnten dadurch die Zeitkonstanten der EPSPs auf 1 ms oder sogar darunter begrenzt werden (Svirskis & Rinzel 2003). Man könnte daher für IPSPs eine ähnliche zeitliche Begrenzung annehmen, wobei *in vivo* mit solchen Zeitkonstanten intrinsischer Leitfähigkeiten ebenfalls eine zeitliche Summation der IPSPs über einen weiten Bereich an für die ITD-Auswertung notwendigen Frequenzen vermieden werden könnte. Um diese Hypothesen zu klären, wäre es hilfreich, wenn ein weiteres MSO-Modell zur Verfügung stehen würde, welches sowohl die intrinsischen, als auch die erregenden und hemmenden synaptischen Eigenschaften der MSO-Neurone enthält. Wenn dieses Modell zudem auf der tatsächlichen anatomischen Geometrie der MSO-Neurone basieren würde, dann könnte damit nicht nur das Verhalten der Zellen bei der ITD-Verarbeitung, sondern auch beispielsweise der Effekt einer räumlichen Beschränkung der glycinergen Synapsen auf die Somaregion näher untersucht werden.

## **5.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit konzentrierte sich auf die Untersuchung der Entwicklung einer spezifischen, räumlich beschränkten Anordnung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus im funktionellen Zusammenhang dieser Neurone bei der initialen Verarbeitung von tieffrequenten Reinton-ITDs im Azimut. Es konnte gezeigt werden, dass sich diese räumliche Differenzierung der glycinergen Synapsen nur dann entwickelt, wenn die MSO-Neurone tatsächlich durch tieffrequenten Schall binaural stimuliert werden. Weiter konnte nachgewiesen werden, dass sich eine solche anatomische Anpassung nur in den Spezies entwickelt, für die eine Analyse interauraler Zeitdifferenzen im Verhaltenskontext sinnvoll erscheint. Zeitgleich mit der Entwicklung einer räumlichen Beschränkung glycinерger Synapsen zeigte sich zellulär in den MSO-Neuronen eine Entwicklung von schnellen intrinsischen Membraneigenschaften und eine Beschleunigung der Kinetik von IPSPs und IPSCs. In einigen Zellen konnten dabei Zeitkonstanten für IPSCs im Sub-Millisekundenbereich beobachtet werden. Wie es scheint, könnte der Entwicklung dieser schnellen IPSCs die räumliche Beschränkung der glycinergen Synapsen zugrundeliegen. Mittels einer Reduzierung von zeitlicher und räumlicher Summation durch die anatomische Anordnung der Synapsen könnte sich die, zur präzisen Auswertung von ITDs notwendige Kinetik der inhibitorischen synaptischen Ströme in den MSO-Zellen erreichen lassen.

Die im Verlauf der Diskussion aufgestellten Hypothesen müssen jetzt durch weitere Experimente *in vivo* und *in vitro* überprüft werden. Insbesondere sollte der mögliche STDP-Mechanismus, welcher der erfahrungsabhängigen Selektion der Synapsen zugrundeliegen könnte, unter kontrollierten Bedingungen *in vitro* untersucht werden. Dabei könnte durch eine zeitliche Paarung von antidromisch stimulierten Aktionspotentialen mit binaural aktivierten IPSCs das STDP-Zeitfenster bestimmt werden, welches über die Verstärkung oder Abschwächung von Synapsen entscheidet. Dabei könnte auch eine mögliche Calciumabhängigkeit des Mechanismus der Synapsenselektion untersucht werden. Zudem sollte durch weitere *in vitro* Experimente untersucht werden, wie sich die Kinetik der IPSPs und IPSCs in älteren Wüstenrennmäusen und Ratten entwickelt. Durch einen parallelen immunhistochemischen Nachweis der Verteilung glycinерger Synapsen an diesen Zellen könnte die Verbindung zwischen der räumlichen Beschränkung der Synapsen und der schnellen Kinetik der IPSCs deutlich gemacht werden. In diesem Zusammenhang könnte auch die Untersuchung von Wüstenrennmäusen mit manipulierter auditorischer Erfahrung, beispielsweise durch Aufzucht in omnidirektionalem weißem Rauschen, weiteren Aufschluss bringen. Durch die

Entwicklung eines nahe an den physiologischen, zellulären Eigenschaften der MSO-Neurone entwickelten neuronalen Modells könnten zudem Vorraussagen über die Beiträge der einzelnen physiologischen und anatomischen Entwicklungen im Zusammenhang mit der Funktion der Neurone in der ITD-Verarbeitung getroffen werden. Zudem würde ein solches Modell auch die Möglichkeit bieten, die Eigenschaften der MSO-Zellen in der Zeitverarbeitung zwischen ITDs nutzenden und nicht nutzenden Spezies zu vergleichen. Für dieses Modell wäre daher auch eine *in vitro* elektrophysiologische Untersuchung der EPSPs / EPSCs nötig.

Wenn die genannten Hypothesen durch neue Experimente gestützt werden, dann könnte dies zusammen mit dieser Arbeit die Basis schaffen, die MSO als ideales Modellsystem zur Untersuchung von aktivitäts- und erfahrungsabhängigen Entwicklungsprozessen inhibitorischer Synapsen zu etablieren. Die MSO als Modellsystem würde eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Modellsystemen aufweisen. So bestehen nur wenige, in ihrer Funktion und Physiologie klar definierte Eingänge, welche durch ihre anatomische Lage im SOC gut experimentell zugänglich sind. Ein weiterer und vielleicht noch wichtigerer Punkt, ist die einem klaren Verhaltenskontext zugeordnete Funktion der Zellen und der inhibitorischen Synapsen in der initialen Verarbeitung von ITDs. Dies ermöglicht es Entwicklungsvorgänge eindeutig mit der Funktion der Zellen *in vivo* und dem Verhalten des Tieres in Verbindung zu setzen und gewährleistet eine sinnvolle und aussagefähige Interpretation der Daten. Desweiteren eröffnet die MSO durch ihre Funktion die Möglichkeit diese Entwicklungsprozesse in einem neuroethologischen Kontext zu analysieren, was einerseits zum Verständnis der Evolution auditorischer Verarbeitung und andererseits zum Verständnis inhibitorischer Systeme im allgemeinen beitragen kann.

## **6 Anhang zu Material und Methoden**

### **6.1 Arbeitsprotokolle der immunhistochemischen Färbungen**

#### **6.1.1 Allgemeine Hinweise zu der Präparation und zu den Färbungen**

##### **6.1.1.1 Betäubung der Tiere**

Vor der Perfusion werden die Tiere mittels einer letalen Dosis an Chloralhydrat (5%ige Lösung in PBS), die intraperitoneal injiziert wird, betäubt. Die Dosierung des Chloralhydrats richtet sich nach dem Körpergewicht des Tieres, die Endkonzentration wird nach der Formel  $0,01 \text{ ml Chloralhydrat} / \text{g Körpergewicht}$  ermittelt.

##### **6.1.1.2 Perfusion**

Sobald das Tier nach der Betäubung keine Reaktion mehr auf Berührungsreize zeigt, wird es mit Plastilinstreifen auf dem Rücken liegend auf dem Perfusionstisch fixiert. Mit einer Schere wird das Fell am Bauch und an den beiden Seiten bis zum Hals geöffnet und vom darunterliegenden Bindegewebe getrennt. Nach der analogen Öffnung der Haut wird der Brustkorb mit einer am Sternum angesetzten Pinzette etwas Richtung Kopf gezogen, das Zwerchfell mit einem Skalpell eingeschnitten und vom Brustkorb abgetrennt. Durch zwei seitliche Scherenschnitte den Brustkorb öffnen und Richtung Kopf aufklappen, sowie mit einer Klammer fixieren. Bei der Präparation ist darauf zu achten die Lunge nicht zu verletzen. Den Herzbeutel mit einer Pinzette öffnen und abziehen. Zu diesem Zeitpunkt sollte das Herz noch sichtbar schlagen, um eine gute Fixierung des Gewebes zu erzielen. Danach das Herz mit einer stumpfen Pinzette leicht halten, die Kanüle vorsichtig in den linken Ventrikel einstechen und etwas in Richtung linker Vorhof schieben. Danach zeitgleich den rechten Vorhof mit einer spitzen Schere öffnen und die Schlauchpumpe einschalten um die Perfusion zu beginnen. Es muss darauf geachtet werden, weder in den rechten Ventrikel zu stechen, noch die Kanüle zu weit in den linken Vorhof zu schieben bzw. diesen zu verletzen. Die Perfusion mit der Ringerlösung ist notwendig, um das Blut vollständig aus allen Kapillaren zu entfernen. Die Zugabe von Heparin verhindert dabei die Koagulation des Blutes und damit einen Verschluss feiner Gefäße. Einen Hinweis auf eine erfolgreiche Perfusion stellt die Entfärbung der Leber und das deutlichen Verkrampfen des Tieres beim Einstromen der Fixierlösung dar.

##### **6.1.1.3 Präparation des fixierten Gehirns**

Nach Abschneiden des Kopfes und Öffnen der Schädelhaut wird die Schädeldecke von rostral nach caudal mit einer Pinzette entfernt. Ebenfalls von rostral beginnend das freigelegte Gehirn mit einer Pinzette von der Schädelbasis abheben und Richtung caudal kippen. Die ventral austretenden Gehirnnerven dazu durchtrennen.

##### **6.1.1.4 Anfertigen der Schnitte**

Welche Art von Schnitten bei welcher Schnittdicke angefertigt werden sollen, hängt von der



nachfolgenden Färbung ab und ist jeweils bei den entsprechenden Protokollen erwähnt und beschrieben. Um Schnitte des SOC zu erhalten, wird das Gehirn im allgemeinen von caudal nach rostral und zugleich von dorsal nach ventral geschnitten. Bis der absteigende Ast des Facialisnervens auf den Schnitten erkennbar ist, kann die Schnittdicke zwischen 100 und 400 µm variiert werden. Diese Schnitte dienen nur der Orientierung um den SOC, dessen Beginn in etwa mit der Lage des absteigenden Facialisnervens zusammenfällt, im Gehirn zu lokalisieren.

#### **6.1.1.5 Immunhistochemische Färbungen**

Bei der Durchführung der Färbungen können verschiedene Methoden angewandt werden. Prinzipiell kann zwischen der freischwimmenden und der Objektträgerfärbung unterschieden werden. Desweiteren bestehen verschiedene Möglichkeiten das zu untersuchende Antigen sichtbar zu machen. Das Antigen kann über eine Reihe von Antikörperreaktionen beispielsweise durch einen Fluoreszenzfarbstoff oder durch eine Oxidationsreaktion von Di-amino-benzidin (DAB) angefärbt werden. Welche Methode zur Anwendung kommt hängt von mehreren Faktoren ab. Zu diesen zählen, ohne im Detail näher darauf einzugehen, die Art und die Stabilität des Antigens und der Antikörper, oder die Art der Fragestellung. Die Fluoreszenzfärbung bietet z.B. den Vorteil, dass mehrere Antigene im selben Schnitt untersucht werden können, sie eröffnet auch die Möglichkeit durch konfokale Laser-scanning Mikroskopie die räumliche Verteilung bestimmter Antigene genauer zu untersuchen. Im wesentlichen sind die Besonderheiten des jeweiligen Färbungstyps in den Protokollen im Detail beschrieben. Von einer nicht zu unterschätzenden Bedeutung für eine erfolgreiche und spezifische Färbung ist das Waschen nach den einzelnen Inkubationsschritten. Auch wenn die Anzahl und Dauer der Wascheinheiten in den verschiedenen Protokollen unter Umständen hoch erscheinen mag, ist es jedoch unbedingt notwendig, diese genau einzuhalten um eine qualitativ hochwertige Immunfärbung zu gewährleisten. Einige weitere allgemeine Hinweise werden in den folgenden Kapiteln kurz dargestellt.

##### ***6.1.1.5.1 Allgemeine Hinweise zur Behandlung von Antikörpern***

Da Antikörper sehr empfindliche Proteinstrukturen darstellen, müssen sie mit der gebotenen Sorgfalt behandelt werden. Die Stabilität und damit auch die Funktionalität der Antikörper hängt unter anderem von der Temperatur ab, bei der die Antikörper gelagert oder verwendet werden. Bei Raumtemperatur sind die Antikörper im allgemeinen einige Stunden stabil, bei 4°C einige Tage. Die Antikörper sollten nach Möglichkeit immer auf Eis pipettiert werden, um ein Degenerieren der Proteine zu verhindern. Um größere Mengen Antikörper für längere Zeit zu lagern, muss die Stocklösung in Aliquots aufgeteilt werden. Die Größe der Aliquots richtet sich dabei nach der Menge an Antikörper, die für eine Färbung benötigt wird. Erfahrungsgemäss ist eine Menge von 2 – 6 µl pro Aliquot für primäre und 5 – 10 µl für sekundäre Antikörper ausreichend. Das Aliquotieren erfolgt auf Eis, dabei Handschuhe tragen um die Antikörper nicht zu verunreinigen. Die Eppendorffröhrchen dabei gut verschließen und den Deckel mit Parafilm abdichten um ein Verdampfen der Flüssigkeit zu verhindern. Die Aliquots danach kurz zentrifugieren und bei –20°C oder –80°C lagern. Einmal aufgetaute Antikörper dürfen nicht wieder eingefroren werden.

##### ***6.1.1.5.2 Arbeiten mit Triton x 100 oder anderen Tensiden***

Das nicht-ionische Tensid Triton x 100 lässt sich aufgrund seiner zähflüssigen, schmierigen

Konsistenz nur sehr schlecht pipettieren, d.h. kleine Mengen, wie sie für die immunhistochemischen Färbungen benötigt werden, können nur sehr ungenau abgemessen werden. Es empfiehlt sich daher Stocklösungen (100 ml) mit den verschiedenen Konzentrationen in Puffer anzulegen. Zum pipettieren von Triton x 100 o.ä. (z.B. Tween 20) am besten eine abgeschnittene 5 ml Eppendorfpipettenspitze verwenden.

#### ***6.1.1.5.3 Kontrolle der Spezifität einer Antikörperfärbung***

Die immunhistochemischen Färbungen beruhen auf der selektiven Bindung von Antikörpern an charakteristische Strukturen des Antigens (primärer Antikörper). Die spezifische Bindung des sekundären Antikörpers an den primären beruht auf der selektiven Reaktion genau aufeinander abgestimmter Immunglobulinbestandteile (IgGs). Ist der sekundäre Antikörper an Biotin gekoppelt, so kann ein tertiärer Antikörper mittels einer Avidin-Biotin Reaktion an diesen gekoppelt werden. Durch verschiedene, an die Antikörper gebundene Chromogene (z.B. Fluoreszenz) kann das Endprodukt dieser Immunreaktionen und damit das gesuchte Antigen sichtbar gemacht werden. Da es sich bei diesen Prozessen um dynamische Gleichgewichtsreaktionen handelt, kann es neben der gewünschten Bindung des Antikörpers auch zu unspezifischen Reaktionen der verschiedenen Antikörper (primär, sekundär, tertiär) kommen. Um zu überprüfen ob, und wenn ja bis zu welchem Grad, solche unspezifischen Reaktionen bei einer Färbung auftreten, ist es unbedingt notwendig bei jeder Färbung Kontrollschnitte mitzuverarbeiten. Da sich selbst verschiedene Chargen eines Antikörpers des gleichen Herstellers unterscheiden können, sollten die Kontrollen immer durchgeführt werden. Eine Möglichkeit der Kontrolle stellt das Weglassen eines Antikörpers (primär, sekundär, tertiär) dar. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Schnitte von Gehirngebieten von denen bekannt ist, dass sie ein bestimmtes Antigen gar nicht oder sehr stark exprimieren, zu prozessieren.

#### ***6.1.1.5.4 Behandlung von Fluoreszenz***

Im Gegensatz zur DAB-Färbung, stellt die Markierung von Antigenen mit Fluoreszenzfarbstoffen keine dauerhafte Färbung dar. Deshalb sollten bei der Anwendung dieser Methoden einige Vorgehensweisen beachtet werden. Da Fluoreszenzfarbstoffe lichtempfindlich sind, sollten sie immer möglichst dunkel oder lichtgeschützt verarbeitet werden. Die gefärbten Schnitte sollten aus dem gleichen Grund dunkel gelagert werden. Selbst wenn die Fluoreszenzfarbstoffe nicht durch Licht angeregt werden, wird die Fluoreszenz in den Schnitten mit der Zeit schwächer. Auch kann es zu einem „Ausfließen“ des Fluoreszenzfarbstoffes von gefärbten Strukturen in nicht gefärbte Bereiche kommen, was wiederum die Hintergrundfluoreszenz erhöht und den Signal-Rauschabstand vermindert. Diese Prozesse können nicht verhindert, aber durch Lagerung der Schnitte bei 4°C oder –20°C deutlich verlangsamt werden. In jedem Fall sollten die gefärbten Schnitte möglichst schnell (max. 14 Tage) nach der Färbung am Epifluoreszenzmikroskop oder am konfokalen Laser-scanning Mikroskop analysiert werden. Bei der Durchführung von fluoreszenten Doppelfärbungen muss darauf geachtet werden, dass sich die Exzitations- und Emissionsspektren der beiden Farbstoffe möglichst wenig überlappen. Ist dies nicht der Fall können die beiden gefärbten Strukturen nicht eindeutig voneinander getrennt werden.

### 6.1.1.5.5 Hinweise zur Objektträgerfärbung

Neben der freischwimmenden Färbung der Gehirnschnitte besteht auch die Möglichkeit die Schnitte schon aufgezogen, direkt auf dem Objektträger, zu färben. Ob die Färbung auf dem Objektträger durchgeführt wird kann von mehreren Faktoren, wie z.B. der Art der Präparation und damit der Art des Antigens (z.B. 1.3. Protokoll Glycinrezeptorfärbung) oder aber auch von ökonomischen Überlegungen abhängen. Da bei der Objektträgerfärbung nur sehr kleine Mengen an Flüssigkeit verwendet werden, kann so der Verbrauch von teuren und/oder wertvollen Antikörpern minimiert werden. Desweiteren bietet die Objektträgerfärbung die Möglichkeit mehrere Färbungen an verschiedenen Schnitten desselben Gehirns zeitgleich durchzuführen. Durch die geringen Mengen an Flüssigkeit, die während der Färbung auf die Schnitte gegeben werden, besteht allerdings die Gefahr der Austrocknung der Schnitte. Da die Immunreaktionen, die zur Markierung der Antigene führen nur wässriger Lösung durchgeführt werden können, bedeutet dies ein Fehlschlagen der Reaktion. Um das Austrocknen der Schnitte während der Färbung zu verhindern, muss die Objektträgerfärbung in einer sog. feuchten Kammer durchgeführt werden. Die feuchte Kammer besteht aus einem niedrigen Gefäß mit gut schließendem Deckel (möglichst lichtdicht bei Fluoreszenzfärbungen), dessen Boden zuerst mit Papiertüchern ausgelegt wird. Die Papiertücher werden dann mit soviel Puffer übergossen, dass die Flüssigkeit einige Millimeter hoch in der Kammer steht. Auf die nassen Papiertücher wird ein Gitter gelegt, auf das danach die Objektträger platziert werden. Durch die feuchtigkeitsgesättigte Atmosphäre in der Kammer wird ein Verdunsten der Inkubationslösung auf den Schnitten verhindert. Bei längeren Inkubationszeiten empfiehlt es sich die Kammer zusätzlich von außen mit Parafilm abzudichten. Wie bei allen Färbungen, so sollten die Schnitte auch bei der Objektträgerfärbung immer in einer großen Menge Puffer gewaschen werden. Die Schnitte werden daher nicht in der feuchten Kammer, sondern zu mehreren in Küvetten mit Puffer gewaschen.

## 6.1.2 Protokoll Glycin – MAP2-Färbung (Gefrierschnitte) [Fluoreszenz-Doppelfärbung oder DAB-Färbung]

### A) Präparation des Gehirns, Anfertigen und Lagern der Schnitte

#### I. Perfusion

1. Tier mit letaler Dosis Chloralhydrat (5%) betäuben
2. 5 min spülen mit 0,9% NaCl + 0,02% Heparin + 0,02% Lidocain in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. 30 min fixieren mit 4% Paraformaldehyd + 0,1% Glutaraldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Das Gehirn sofort danach präparieren
5. 2 x 30 min bei 4°C waschen in PBS 0,1 mol, pH 7,4

#### II. Kryoprotektion

1. 2 h in 10% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. 20% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4 bis zum Absinken des Gehirns
3. 30% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4 über Nacht oder bis zum Absinken des Gehirns in der Zuckerlösung

**III. Anfertigen der Schnitte**

1. Trimmen des Gehirns
  - Den Cortex rostral mit einer Skalpellklinge so abschneiden, dass das Stammhirn bei aufrechter Stellung des Gehirns auf der Schnittfläche senkrecht steht.
2. Das Schneiden des Gehirns erfolgt im Kryostaten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder am Gefrierschlittenmikrotom
3. Das Gehirn auf einen Metallblock im Kryostaten oder auf das Peltierelement am Gefrierschlittenmikrotom auffrieren
  - Einen Tropfen TissueTec auf den kalten Metallblock oder das Peltierelement geben und frieren lassen
  - Den TissueTec Tropfen plan schneiden
  - Einen weiteren Tropfen TissueTec auf die plane Fläche geben
  - Das getrimmte Gehirn mit der abgeschnittenen Cortexfläche senkrecht in den Tropfen stellen und festfrieren lassen
  - Das Gehirn vollständig mit vorgekühltem TissueTec bedecken und komplett einfrieren
4. Schneiden des eingebetteten Gehirns
  - Coronale Schnitte mit einer Schnittdicke von  $25\text{ }\mu\text{m}$  anfertigen
  - Die Schnitte freischwimmend in PBS  $0,1\text{ mol}$ , pH  $7,4$  auffangen
5. Lagerung der Schnitte
  - Die Schnitte können für einige Monate in Frostschutzlösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden
    - Ansatz Frostschutzlösung (nach Savander et al. 1995):
      - 30% Ethylenglycol
      - 25% Glycerin
      - in 0,05% PBS

**B) Protokoll der immunhistochemischen Färbung****I. Vorbereitung der Färbung**

1. Entnehmen der Schnitte aus der Frostschutzlösung
  - 3 x 10 min waschen in PBS  $0,1\text{ mol}$ , pH  $7,4$
2. Auswählen der Schnitte unter dem Mikroskop
  - Prüfen ob die Schnitte intakt sind und ob der SOC erkennbar ist
3. Die Schnitte freischwimmend färben
  - Die Färbung in 24-Loch-Zellkulturplatten durchführen
  - 6 Schnitte pro Loch verwenden
  - Die Schnitte mit einem Glashaken transportieren
4. Die benötigte Flüssigkeitsmenge beträgt mindestens  $500\text{ }\mu\text{l}$  pro Loch, für alle Schritte außer den Antikörperinkubationen ist es besser die Flüssigkeitsmenge auf  $1,0 - 1,5\text{ ml}$  zu erhöhen.
5. Alle Schritte werden auf dem Schüttler und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt.

## II. Färbung Tag 1

1. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität
  - 10 min Inkubation
    - 10% Methanol + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Aufbrechen von Aldehydquervernetzungen am Antigen
  - 15 min Inkubation
    - 0,1 mol Natriumborohydrid in PBS 0,1 mol, pH 7,4 (38 mg NaBH<sub>4</sub> in 10 ml PBS)
5. Waschen
  - 1 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  - 2 x 10 min in PBS-T
6. Präinkubation
  - a) 60 min Inkubation
    - 0,3% Triton x 100 + 10% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  - b) 10 min Inkubation
    - 0,3% Triton x 100 + 2% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
7. Inkubation primäre Antikörper
  - 48 h Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Die Antikörperlösung auf Eis ansetzen
  - Kontrollschnitte ohne primäre Antikörper
    - a) Ansatz fluoreszente Doppelfärbung: Glycin / MAP2
      - anti-Glycin-Antikörper: 1:600
      - anti-MAP2-Antikörper: 1:250
      - 0,3% Triton x 100
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen
    - b) Ansatz DAB-Einfachfärbung: Glycin
      - anti-Glycin-Antikörper: 1:20000
      - 0,3% Triton x 100
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen

## III. Färbung Tag 2

### A) Fluoreszenzfärbung (Schnitte immer dunkel halten!)

1. Waschen

- 4 x 10 min in PBS-T + 2% NGS
- 2. Inkubation sekundäre Antikörper
  - 6 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln
  - Die Antikörperaliquots lichtgeschützt auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Kontrollschnitte ohne sekundäre Antikörper
    - a) Ansatz fluoreszente Doppelfärbung:
      - Ziege-anti-Kaninchen-Cy3: 1:600 (Glycin)
      - Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488: 1:300 (MAP2)
      - 0,3% Triton x 100
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen
- 3. Waschen (dunkel)
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 4. Aufziehen der Schnitte (lichtgeschützt)
  - Die Schnitte aus H<sub>2</sub>Odd mit einem Pinsel auf Gelatineobjektträger aufziehen, dabei die Reihenfolge der Schnitte beachten
  - Je 2 Schnitte pro Objektträger
  - Die Schnitte nur leicht antrocknen lassen. Nicht voll trocknen lassen sonst entsteht unspezifische Hintergrundfärbung.
- 5. Eindecken der Schnitte (lichtgeschützt)
  - Mit Gel/Mount oder anderem anti-fading Einbettmedium eindecken
    - Ein Tropfen Gel/Mount pro Schnitt genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
  - Pro Schnitt ein Deckglas verwenden
  - Überschüssiges Gel/Mount und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
  - Die Schnitte trocknen lassen und bei 4°C dunkel lagern

#### B) DAB-Färbung

1. Waschen
  - 4 x 10 min in PBS-T +2% NGS
2. Inkubation sekundärer Antikörper
  - 6 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Kontrollschnitte ohne sekundäre Antikörper
    - b) Ansatz DAB-Einfachfärbung:
      - Ziege-anti-Kaninchen-Biotin: 1:300 (Glycin)
      - 0,3% Triton x 100
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4

- Ansatz kurz vortexen
3. Waschen
    - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  4. Inkubation tertiärer Antikörperkomplex
    - 2 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
    - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen damit sich der ABC-Komplex bilden kann
    - Kontrollschnitte ohne tertiären Antikörperkomplex

c) Ansatz ABC-Komplex:

    - ABC-Kit Lösung A: 1:100
    - ABC-Kit Lösung B: 1:100
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  5. Waschen
    - 3 x 10 min in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
  6. DAB-Reaktion
    - Vorsicht DAB ist giftig und krebserregend
    - Immer unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen
    - Mit DAB kontaminierte Abfälle gesondert entsorgen

a) DAB-Reaktion (1)

    - 10 min Präinkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler

i. Ansatz DAB (1):

    - 0,05% DAB
    - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4

b) DAB-Reaktion (2)

    - ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
    - Die Reaktionszeit richtet sich nach der Intensität der Färbung
    - Wenn die Schnitte eine mittelbraune Färbung zeigen wird die Reaktion abgebrochen

ii. Ansatz DAB (2):

    - 0,05% DAB
    - 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
    - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
  7. Abbrechen der DAB-Reaktion / Waschen
    - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  8. Aufziehen der Schnitte
    - Die Schnitte aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einem Pinsel auf Gelatineobjektträger aufziehen, dabei die Reihenfolge der Schnitte beachten
    - Je 6 – 8 Schnitte pro Objektträger
    - Die Schnitte auf dem Trockentisch komplett trocknen lassen
  9. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe
    - Je 2 min in:
      - 1 x Ethanol 50%

- 1 x Ethanol 70%
- 1 x Ethanol 96%
- 2 x Ethanol 100%
- 3 x Xylol

#### 10. Eindecken der Schnitte

- Die Objektträger sofort nach dem Herausnehmen aus der letzten Xylolstufe (die Schnitte dürfen nicht trocknen) mit Entellan eindecken
  - Wenig Entellan genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
- Pro Objektträger ein Deckglas verwenden
- Überschüssiges Entellan und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
- Die Schnitte über Nacht trocknen lassen

### 6.1.3 Protokoll Glycinrezeptor – MAP2-Färbung (Gefrierschnitte) [Fluoreszenz-Doppelfärbung oder DAB-Färbung]

#### A) Präparation des Gehirns, Anfertigen, Lagern und Fixieren der Schnitte

##### I. Präparation des Gehirns mit der N<sub>2</sub> liq. Methode

1. Tier mit letaler Dosis Chloralhydrat (5%) betäuben
2. 5 min Perfusion mit frisch hergestellter ACSF-Perfusionslösung

Ansatz ACSF-Perfusionslösung:

- |  |          |
|--|----------|
| • NaCl                                 | 7,30 g/l |
| • KCL                                  | 0,30 g/l |
| • KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 0,16 g/l |
| • MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O | 0,32 g/l |
| • NaHCO <sub>3</sub>                   | 2,19 g/l |
| • D(+)-Glucose                         | 2,70 g/l |
| • CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O | 0,35 g/l |
| • L(+)-Ascorbinsäure                   | 0,08 g/l |
| • in H <sub>2</sub> Odd lösen          |          |
| • Heparin 0,02%                        |          |

- Jeden Bestandteil vor Zugabe des Folgenden vollständig lösen
3. Das Gehirn sofort nach der Perfusion schnell präparieren
    - Die Präparation sollte schnell sein, da das Gehirn nicht fixiert ist und die Proteine deshalb schnell denaturieren
    - Trotzdem muss die Präparation sehr umsichtig erfolgen, da das unfixierte Gehirn leicht zerstört werden kann!
  4. Trimmen des Gehirns



- Den Cortex rostral mit einer Skalpellklinge so abschneiden, dass das Stammhirn bei aufrechter Stellung des Gehirns auf der Schnittfläche senkrecht steht.
5. Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff
    - Vorsicht nur unter dem Abzug arbeiten, Handschuhe und Schutzbrille tragen
    - Vorsicht Isopentan ist extrem flüchtig, explosiv und giftig
    - Isopentan in flüssigem Stickstoff kurz vorkühlen, das Isopentan darf dabei noch nicht gefroren sein
    - Das getrimmte Gehirn in das vorgekühlte Isopentan legen
    - Das Gehirn in Isopentan für 4 min in flüssigem Stickstoff gefrieren lassen
  6. Lagern des gefrorenen Gehirns
    - Das Gehirn mit großer Pinzette vorsichtig aus dem Isopentan holen
    - Das Gehirn in Alufolie wickeln, beschriften und in Trockeneis aufbewahren
    - Die präparierten Gehirne bei  $-80^{\circ}\text{C}$  lagern

## II. Anfertigen der Schnitte

1. Das Schneiden des Gehirns erfolgt im Kryostaten bei  $-20^{\circ}\text{C}$
2. Das Gehirn auf einen Metallblock im Kryostaten auffrieren
  - Einen Tropfen TissueTec auf den kalten Metallblock geben
  - Sofort das getrimmte Gehirn mit der abgeschnittenen Cortexfläche senkrecht in den Tropfen stellen und anfrieren lassen
  - Das Gehirn vollständig mit vorgekühltem TissueTec bedecken und auf Trockeneis komplett einfrieren
3. Schneiden des eingebetteten Gehirns
  - Das eingebettete Gehirn vor dem Schneiden einige Zeit im Kryostaten adaptieren lassen, damit die Blocktemperatur nicht kälter als  $-20^{\circ}\text{C}$  ist (wenn das Präparat zu kalt ist können die Schnitte brechen)
  - Coronale  $25\text{ }\mu\text{m}$  Schnitte tauend auf gelatinierte Objektträger aufziehen
  - 2 Schnitte pro Objektträger
  - Die Schnitte kurz bei Raumtemperatur trocknen lassen
  - Danach die Objektträger auf Trockeneis lagern
  - Da das Gewebe nicht fixiert ist, sollten die Schnitte vorsichtig behandelt werden
4. Lagerung der Objektträger
  - Die Schnitte können für kurze Zeit (1 – 2 Tage) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden
  - Für längere Zeit sollten die Schnitte bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden

## III. Fixierung der Schnitte

1. Die Objektträger mit den Schnitten an die Raumtemperatur adaptieren lassen, damit das Fixativ nicht gefriert
2. Fixierung
  - Die Objektträger mit den Schnitten für 5 min in 4% Paraformaldehyd stellen
3. Waschen
  - 5 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Die Schnitte danach immer feucht halten und nicht austrocknen lassen!

**B) Protokoll der immunhistochemischen Färbung****I. Vorbereitung**

1. Die Schnitte werden direkt auf dem Objektträger gefärbt
2. Auswählen der Schnitte unter dem Mikroskop
  - Prüfen ob die Schnitte intakt sind und ob der SOC erkennbar ist
3. Mit dem PAP-Pen Ringe um die ausgewählten Schnitte ziehen, der Objektträger muss dabei trocken sein, der Schnitt muss feucht bleiben
4. Alle Schritte der Färbung werden in einer feuchten Kammer durchgeführt
5. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt (soweit nicht anders angegeben)
6. Die benötigte Flüssigkeitsmenge pro Schnitt beträgt 100 µl (soweit nicht anders angegeben)
7. Wechsel der Lösungen auf den Schnitten
  - Die vorhergehende Lösung abschütteln und die nächste Lösung mit einer Eppendorffpipette vorsichtig auf die Schnitte geben
  - Die Schnitte während des Lösungswechsels nicht austrocknen lassen
8. Die Objektträger mit den Schnitten werden in Küvetten mit Puffer auf dem Schüttler gewaschen

**II. Färbung Tag1**

1. Waschen
  - 1 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität
  - 10 min Inkubation
    - 10% Methanol + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Präinkubation
  - a) 60 min Inkubation
    - 0,5% Triton x 100 + 10% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  - b) 10 min Inkubation
    - 0,5% Triton x 100 + 2% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
5. Inkubation primäre Antikörper
  - Min. 12 h Inkubation bei 4°C
  - Die feuchte Kammer mit Parafilm abdichten um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Die Antikörperlösung auf Eis ansetzen und erst im Kühlraum bei 4°C auf die Schnitte geben
  - Kontrollschnitte ohne primäre Antikörper
  - 50 µl Lösung pro Schnitt verwenden
    - a) Ansatz fluoreszente Doppelfärbung: Glycinrezeptor / MAP2

- anti-Glycinrezeptor-Antikörper: 1:100
  - anti-MAP2-Antikörper: 1:100
  - 0,5% Triton x 100
  - 2% NGS
  - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  - Ansatz kurz vortexen
- b) Ansatz DAB-Einfachfärbung: Glycinrezeptor
- anti-Glycinrezeptor-Antikörper: 1:175
  - 0,5% Triton x 100
  - 2% NGS
  - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  - Ansatz kurz vortexen

### III. Färbung Tag 2

#### A) Fluoreszenzfärbung (Schnitte immer dunkel halten)

1. Waschen
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Inkubation sekundäre Antikörper
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
  - Die feuchte Kammer dazu in Alufolie einschlagen, vorher die Kammer mit Parafilm abdichten um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern
  - Die Antikörperaliquots lichtgeschützt auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Kontrollschnitte ohne sekundäre Antikörper
  - 50 µl Lösung pro Schnitt verwenden
    - a) Ansatz fluoreszente Doppelfärbung:
      - Ziege-anti-Kaninchen-Cy3: 1:300 (GlyR)
      - Ziege-anti-Maus-Alexa Fluor 488: 1:200 (MAP2)
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen
3. Waschen (dunkel)
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Eindecken der Schnitte (lichtgeschützt)
  - Objektträger mit den Schnitten 1x kurz in H<sub>2</sub>O ddippen
  - Mit Gel/Mount oder anderem anti-fading Einbettmedium eindecken
    - Ein Tropfen Gel/Mount pro Schnitt genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
  - Pro Schnitt ein Deckglas verwenden
  - Überschüssiges Gel/Mount und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
  - Die Schnitte trocknen lassen und bei 4°C dunkel lagern

B) DAB-Färbung

1. Waschen
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Inkubation sekundärer Antikörper
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur
  - Vorher die feuchte Kammer mit Parafilm abdichten um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Kontrollschnitte ohne sekundäre Antikörper
  - 50 µl Lösung pro Schnitt verwenden
  - b) Ansatz DAB-Einfachfärbung:
    - Ziege-anti-Kaninchen-Biotin: 1:300 (GlyR)
    - 2% NGS
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
    - Ansatz kurz vortexen
3. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Inkubation tertiärer Antikörperkomplex
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur
  - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen damit sich der ABC-Komplex bilden kann
  - Kontrollschnitte ohne tertiären Antikörperkomplex
  - c) Ansatz ABC-Komplex:
    - ABC-Kit Lösung A: 1:100
    - ABC-Kit Lösung B: 1:100
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
5. Waschen
  - 3 x 10 min in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
6. DAB-Reaktion
  - Vorsicht DAB ist giftig und krebserregend
  - Immer unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen
  - Mit DAB kontaminierte Abfälle gesondert entsorgen
  - a) DAB-Reaktion (1)
    - 10 min Präinkubation bei Raumtemperatur
    - i. Ansatz DAB (1):
      - 0,05% DAB
      - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
  - b) DAB -Reaktion (2)
    - ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur
    - Die Reaktionszeit richtet sich nach der Intensität der Färbung
    - Wenn die Schnitte eine mittelbraune Färbung zeigen wird die Reaktion abgebrochen

- ii. Ansatz DAB (2):
  - 0,05% DAB
  - 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
- 7. Abbrechen der DAB-Reaktion / Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 8. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe
  - Je 2 min in:
    - 1 x Ethanol 50%
    - 1 x Ethanol 70%
    - 1 x Ethanol 96%
    - 2 x Ethanol 100%
    - 3 x Xylol
- 9. Eindecken der Schnitte
  - Die Objektträger sofort nach dem Herausnehmen aus der letzten Xylolstufe (die Schnitte dürfen nicht trocknen) mit Entellan eindecken
  - Wenig Entellan genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
  - Pro Schnitt ein Deckglas verwenden
  - Überschüssiges Entellan und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
  - Die Schnitte über Nacht trocknen lassen

### 6.1.4 Protokoll Gephyrinfärbung (Gefrierschnitte)

#### [Fluoreszenz- oder DAB-Färbung mit Signalamplifikation]

##### A) Präparation des Gehirns, Anfertigen und Lagern der Schnitte

###### I. Perfusion

1. Tier mit letaler Dosis Chloralhydrat (5%) betäuben
2. 5 min spülen mit 0,9% NaCl + 0,02% Heparin + 0,02% Lidocain in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. 45 min fixieren mit 4% Paraformaldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Das Gehirn sofort danach präparieren
5. 30 min bei 4°C nachfixieren in 4% Paraformaldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4
6. 2 x 30 min bei 4°C waschen in PBS 0,1 mol, pH 7,4

###### II. Kryoprotektion

1. 2 h in 10% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. 20% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4 bis zum Absinken des Gehirns
3. 30% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4 über Nacht oder bis zum Absinken des Gehirns in der Zuckerlösung

### III. Anfertigen der Schnitte

1. Trimmen des Gehirns
  - Den Cortex rostral mit einer Skalpellklinge so abschneiden, dass das Stammhirn bei aufrechter Stellung des Gehirns auf der Schnittfläche senkrecht steht.
2. Das Schneiden des Gehirns erfolgt im Kryostaten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder am Gefrierschlittenmikrotom
3. Das Gehirn auf einen Metallblock im Kryostaten oder auf das Peltierelement am Gefrierschlittenmikrotom auffrieren
  - Einen Tropfen TissueTec auf den kalten Metallblock oder das Peltierelement geben und frieren lassen
  - Den TissueTec Tropfen plan schneiden
  - Einen weiteren Tropfen TissueTec auf die plane Fläche geben
  - Das getrimmte Gehirn mit der abgeschnittenen Cortexfläche senkrecht in den Tropfen stellen und festfrieren lassen
  - Das Gehirn vollständig mit vorgekühltem TissueTec bedecken und komplett einfrieren
4. Schneiden des eingebetteten Gehirns
  - Coronale Schnitte mit einer Schnittdicke von  $25\text{ }\mu\text{m}$  anfertigen
  - Die Schnitte freischwimmend in PBS  $0,1\text{ mol}$ , pH  $7,4$  auffangen
5. Lagerung der Schnitte
  - Die Schnitte können für einige Monate in Frostschutzlösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden

### B) Protokoll der immunhistochemischen Färbung

#### I. Vorbereitung der Färbung

1. Die Schnitte werden direkt auf dem Objektträger gefärbt
2. Entnehmen der Schnitte aus der Frostschutzlösung
  - $3 \times 10\text{ min}$  waschen in PBS  $0,1\text{ mol}$ , pH  $7,4$
3. Auswählen der Schnitte unter dem Mikroskop
  - Prüfen ob die Schnitte intakt sind und ob der SOC erkennbar ist
4. Die ausgewählten Schnitte auf gelatinisierte Objektträger aufziehen und antrocknen lassen.
5. 2 Schnitte pro Objektträger
6. Mit dem PAP-Pen Ringe um die Schnitte ziehen, der Objektträger muss dabei trocken sein.
7. Alle Schritte der Färbung werden in einer feuchten Kammer durchgeführt
8. Alle Schritte werden bei Raumtemperatur durchgeführt (soweit nicht anders angegeben)
9. Die benötigte Flüssigkeitsmenge pro Schnitt beträgt  $100\text{ }\mu\text{l}$  (soweit nicht anders angegeben)
10. Wechsel der Lösungen auf den Schnitten
  - Die vorhergehende Lösung abschütteln und die nächste Lösung mit einer Eppendorfpipette vorsichtig auf die Schnitte geben
  - Die Schnitte während des Lösungswechsels nicht austrocknen lassen

11. Die Objektträger mit den Schnitten werden in Küvetten mit Puffer auf dem Schüttler gewaschen

## II. Färbung Tag 1

1. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität
  - 10 min Inkubation
    - 10% Methanol + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Präinkubation
  - a) 60 min Inkubation
    - 0,05% Triton x 100 + 10% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  - b) 10 min Inkubation
    - 0,05% Triton x 100 + 2% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
5. Inkubation primärer Antikörper
  - Min. 12 h Inkubation bei 4°C
  - Die feuchte Kammer mit Parafilm abdichten um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Die Antikörperlösung auf Eis ansetzen und erst im Kühlraum bei 4°C auf die Schnitte geben
  - Kontrollschnitte:
    - Kontrolle (1): ohne primären Antikörper, ohne TSA-Kit
    - Kontrolle (2): ohne primären Antikörper, mit TSA-Kit
    - Kontrolle (3): mit primärem Antikörper, ohne TSA-Kit
  - 50 µl Lösung pro Schnitt verwenden
    - a) Ansatz für Färbung mit TSA-Kit:
      - anti-Gephyrin-Antikörper: 1:500
      - 0,05% Triton x 100
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen
    - b) Ansatz für Färbung ohne TSA-Kit:
      - anti-Gephyrin-Antikörper: 1:100
      - 0,05% Triton x 100
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen

**III. Färbung Tag 2****A) Fluoreszenzfärbung (Schnitte immer dunkel halten)**

1. Waschen
  - a) Mit TSA-Kit:
    - 4 x 10 min in TNT-Puffer
  - b) Ohne TSA-Kit:
    - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Inkubation sekundärer Antikörper
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur
  - Die feuchte Kammer dazu in Alufolie einschlagen, vorher die Kammer mit Parafilm abdichten um ein Verdunsten der Lösung zu verhindern
  - Die Antikörperaliquots lichtgeschützt auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Kontrollschnitt ohne sekundäre Antikörper
  - 50 µl Lösung pro Schnitt verwenden
  - a) Ansatz mit TSA-Kit:
    - Ziege-anti-Maus-Biotin: 1:500
    - 2% NGS
    - in TNT-Puffer
    - Ansatz kurz vortexen
  - b) Ansatz ohne TSA-Kit (fluoreszent, dunkel halten):
    - Ziege-anti-Maus-Cy3: 1:500
    - 2% NGS
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
    - Ansatz kurz vortexen
  - c) Ansatz ohne TSA-Kit (DAB):
    - Ziege-anti-Maus-Biotin: 1:200
    - 2% NGS
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
    - Ansatz kurz vortexen
3. Waschen
  - a) Mit TSA-Kit:
    - 3 x 10 min in TNT-Puffer
    - i. Fortsetzung Färbung mit TSA-Kit s.h. Punkt: 5.
  - b) Ohne TSA-Kit (Fluoreszenz):
    - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
    - ii. Fortsetzung Färbung ohne TSA-Kit-Fluo. s.h. Punkt: 4.
  - c) Ohne TSA-Kit (DAB):
    - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
    - iii. Fortsetzung Färbung ohne TSA-Kit-DAB s.h. Punkt: B)1.
4. Eindecken der Schnitte ohne TSA-Kit-Fluo (lichtgeschützt)
  - Objektträger mit den Schnitten 1x kurz in H<sub>2</sub>O ddippen



- Mit Gel/Mount oder anderem anti-fading Einbettmedium eindecken
    - Ein Tropfen Gel/Mount pro Schnitt genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
  - Pro Schnitt ein Deckglas verwenden
  - Überschüssiges Gel/Mount und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
  - Die Schnitte trocknen lassen und bei 4°C dunkel lagern
5. Blocking (1) [mit TSA-Kit]
- 30 min Inkubation in TNB-Puffer bei Raumtemperatur
    - Die TNB-Puffer Aliquots früh genug aus dem –20°C Kühlschrank holen und auftauen lassen
6. Inkubation tertiärer Antikörperkomplex [mit TSA-Kit]
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur
  - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen, damit sich der ABC-Komplex bilden kann
    - a) Ansatz ABC-Komplex:
      - ABC-Kit Lösung A: 1:500
      - ABC-Kit Lösung B: 1:500
      - in TNB-Puffer
7. Waschen [mit TSA-Kit]
- 3 x 10 min in TNT-Puffer
8. Inkubation Tyramid-Biotin [mit TSA-Kit]
- 10 min Inkubation bei Raumtemperatur
  - Das Tyramid-Biotin ist die zentrale Komponente des TSA-Kits und stellt den entscheidenden Signalamplifikationsschritt dar
  - Tyramid-Biotin ist in DMSO gelöst (friert bei 4°C), deshalb die Tyramid-Biotin Stammlösung kurz auftauen lassen
    - a) Ansatz Tyramid-Biotin:
      - Tyramid-Biotin: 1:100
      - in amplification diluent (Bestandteil des TSA-Kits)
9. Waschen [mit TSA-Kit]
- 3 x 10 min in TNT-Puffer
10. Blocking (2) [mit TSA-Kit]
- 30 min Inkubation in TNB-Puffer bei Raumtemperatur
11. Inkubation quartärer Antikörper [mit TSA-Kit]
- 30 min Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln
  - Die feuchte Kammer dazu in Alufolie einschlagen
  - Die Antikörperaliquots lichtgeschützt auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - 50 µl Lösung pro Schnitt verwenden
    - a) Ansatz Fluoreszenzfärbung:
      - Streptavidin-Cy3: 1:1000

- in TNB-Puffer
- Ansatz kurz vortexen
- b) Ansatz für DAB-Färbung (ABC-Komplex):
  - Hinweise zu ABC-Komplex s.h. Punkt: 6.
  - ABC-Kit Lösung A: 1:500
  - ABC-Kit Lösung B: 1:500
  - in TNB-Puffer
- 12. Waschen (dunkel) [mit TSA-Kit]
  - 3 x 10 min in TNT-Puffer
    - i. Fortsetzung Fluoreszenzfärbung s.h. Punkt: 13.
    - ii. Fortsetzung DAB-Färbung s.h. Punkt: B)3.
- 13. Waschen (dunkel) [mit TSA-Kit-Fluo]
  - 1 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 14. Eindecken der Schnitte (lichtgeschützt) [mit TSA-Kit-Fluo]
  - Objektträger mit den Schnitten 1x kurz in H<sub>2</sub>O ddippen
  - Mit Gel/Mount oder anderem anti-fading Einbettmedium eindecken
    - Ein Tropfen Gel/Mount pro Schnitt genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
  - Pro Schnitt ein Deckglas verwenden
  - Überschüssiges Gel/Mount und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
  - Die Schnitte trocknen lassen und bei 4°C dunkel lagern

#### B) DAB-Färbung

1. Inkubation tertiärer Antikörperkomplex [ohne TSA-Kit]
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur
  - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen, damit sich der ABC-Komplex bilden kann
  - a) Ansatz ABC-Komplex:
    - ABC-Kit Lösung A: 1:100
    - ABC-Kit Lösung B: 1:100
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Waschen [ohne TSA-Kit]
  - 3 x 10 min waschen Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
3. DAB-Reaktion [mit / ohne TSA-Kit]
  - Vorsicht DAB ist giftig und krebserregend
  - Immer unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen
  - Mit DAB kontaminierte Abfälle gesondert entsorgen
  - a) DAB-Reaktion (1)
    - 10 min Präinkubation bei Raumtemperatur
      - i. Ansatz DAB (1):

- 0,05% DAB
- in TNT-Puffer
- b) DAB-Reaktion (2)
  - ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur
  - Die Reaktionszeit richtet sich nach der Intensität der Färbung
  - Wenn die Schnitte eine mittelbraune Färbung zeigen wird die Reaktion abgebrochen
  - ii. Ansatz DAB (2):
    - 0,05% DAB
    - 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
    - in TNT-Puffer
- 4. Abbrechen der DAB Reaktion / Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 5. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe
  - Je 2 min in:
    - 1 x Ethanol 50%
    - 1 x Ethanol 70%
    - 1 x Ethanol 96%
    - 2 x Ethanol 100%
    - 3 x Xylol
- 6. Eindecken der Schnitte
  - Die Objektträger sofort nach dem Herausnehmen aus der letzten Xylolstufe (die Schnitte dürfen nicht trocknen) mit Entellan eindecken
    - Wenig Entellan genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
  - Pro Schnitt ein Deckglas verwenden
  - Überschüssiges Entellan und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
  - Die Schnitte über Nacht trocknen lassen

### C) Benötigte Puffer für das NEN-tyramide-signal-amplification-system (TSA-Kit)

#### I. TNT-Puffer

- a) Ansatz für 5 Liter Puffer:
  1. 0,1 mol Tris-HCl
    - 63,5 g Trizma-HCl
    - 11,8 g Trizma-Base
  2. 0,15 mol NaCl
    - 43,83 g NaCl
  3. 0,05% Tween 20
    - 2,5 ml Tween 20
  4. pH 7,5 mit 1 molarer HCl einstellen

- Den Pufferansatz ca. 30 min auf dem Magnetrührer rühren lassen bis sich das Tween vollständig gelöst hat, dann erst pH einstellen
- Der Puffer ist im Dunkeln bei Raumtemperatur für einige Wochen haltbar
- Der Puffer kann auch nur mit Trizma-Base hergestellt werden (ist billiger), dann muss aber der pH-Wert mit konzentrierter (rauchender) HCl eingestellt werden, sonst stimmt die Verdünnung nicht mehr.
- Bei Verwendung von konzentrierter HCl nur unter dem Abzug mit Handschuhen und Schutzbrille arbeiten!

## II. TNB-Puffer (blocking buffer)

b) Ansatz für 100 ml Puffer:

1. 0,1 mol Tris-HCl
    - 1,27 g Trizma-HCl
    - 0,23 g Trizma-Base
  2. 0,15 mol NaCl
    - 0,877 g NaCl
  3. 0,5% NEN-blocking-reagent (Bestandteil des Kits)
    - 0,5 g NEN-blocking-reagent
  4. pH 7,5 mit 1 molarer HCl einstellen
- Den Pufferansatz mindestens 1 h bei 60°C auf dem Magnetrührer rühren lassen bis sich das blocking-reagent vollständig gelöst hat!
  - Nachdem sich das blocking-reagent vollständig gelöst hat, den pH-Wert nochmals überprüfen
  - Den TNB-Puffer in 1 ml Aliquots abfüllen und bei –20°C lagern

## 6.1.5 Protokoll Gephyrinfärbung (Vibratomschnitte) [DAB-Färbung]

### A) Präparation des Gehirns, Anfertigen und Lagern der Schnitte

#### I. Perfusion

1. Tier mit letaler Dosis Chloralhydrat (5%) betäuben
2. 5 min spülen mit 0,9% NaCl + 0,02% Heparin + 0,02% Lidocain in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. 45 min fixieren mit 4% Paraformaldehyd + 0,2% Glutaraldehyd + 0,2% Pikrinsäure (nicht unbedingt notwendig) in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Das Gehirn sofort danach präparieren
5. 5 h bei 4°C nachfixieren in 4% Paraformaldehyd + 0,2% Glutaraldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4
6. Über Nacht waschen bei 4°C in PBS 0,1 mol, pH 7,4

#### II. Anfertigen der Schnitte

1. Trimmen des Gehirns
  - Den Cortex rostral mit einer Skalpellklinge so abschneiden, dass das Stammhirn bei

aufrechter Stellung des Gehirns auf der Schnittfläche senkrecht steht.

2. Das Schneiden des Gehirns erfolgt am Vibratom bei Raumtemperatur
3. Einbetten des Gehirns in Agar
  - 5% Agar herstellen und in eine Petrischale gießen
  - Das getrimmte Gehirn senkrecht, mit der abgeschnittenen Cortexfläche nach unten in den noch flüssigen, handwarmen Agar stellen
  - Sobald der Agar völlig erkaltet und fest ist, mit einer Skalpellklinge einen kleinen Agarblock der das Gehirn enthält ausschneiden
  - Agarblock mit Superkleber in die Schneideschale kleben
  - Halbierte Rasierklinge in den Messerhalter am Vibratom einspannen
  - Schneideschale einsetzen und mit gekühltem (4°C) PBS 0,1 mol, pH 7,4 auffüllen, den Agarblock dabei völlig mit Puffer bedecken
4. Schneiden des eingebetteten Gehirns
  - Coronale Schnitte mit einer Schnittdicke von 30 µm anfertigen
  - Die Schnittgeschwindigkeit sollte sehr langsam sein
  - Die Schnitte freischwimmend in PBS 0,1 mol, pH 7,4 auffangen
5. Lagerung der Schnitte
  - Die Schnitte können über Nacht bei 4°C in PBS 0,1 mol, pH 7,4 aufbewahrt werden
  - Nicht länger lagern

## **B) Protokoll der immunhistochemischen Färbung**

### **I. Vorbereitung der Färbung**

1. Auswählen der Schnitte unter dem Mikroskop
  - Prüfen ob die Schnitte intakt sind und ob der SOC erkennbar ist
2. Die Schnitte freischwimmend färben
  - Die Färbung in 24-Loch-Zellkulturplatten durchführen
  - 4 Schnitte pro Loch verwenden
  - Die Schnitte mit einem Glashaken transportieren
3. Die benötigte Flüssigkeitsmenge beträgt mindestens 500 µl pro Loch, für alle Schritte außer den Antikörperinkubationen ist es besser die Flüssigkeitsmenge auf 1,0 – 1,5 ml zu erhöhen.
4. Alle Schritte werden auf dem Schüttler und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **II. Färbung Tag 1**

1. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität
  - 10 min Inkubation
    - 10% Methanol + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4

4. Aufbrechen von Aldehydquervernetzungen am Antigen
  - 20 min Inkubation
    - 0,1 mol Natriumborohydrid in PBS 0,1 mol, pH 7,4 (38 mg NaBH<sub>4</sub> in 10 ml PBS)
5. Waschen
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
6. Präinkubation
  - 60 min Inkubation
    - 0,1% Triton x 100 + 10% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
7. Inkubation primärer Antikörper
  - Min. 12 h Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Die Antikörperlösung auf Eis ansetzen
  - Kontrollschnitte ohne primären Antikörper
    - a) Ansatz für DAB-Färbung:
      - anti-Gephyrin-Antikörper: 1:100
      - 0,1% Triton x 100
      - 10% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen

### III. Färbung Tag 2

1. Waschen
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Inkubation sekundärer Antikörper
  - 3 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Kontrollschnitte ohne sekundären Antikörper
    - b) Ansatz für DAB-Färbung
      - Ziege-anti-Maus-Biotin: 1:200
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen
3. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Inkubation tertiärer Antikörperkomplex
  - 3 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen damit sich der ABC-Komplex bilden kann
  - Kontrollschnitte ohne tertiären Antikörperkomplex
    - c) Ansatz ABC-Komplex:
      - ABC-Kit Lösung A: 1:100

- ABC-Kit Lösung B: 1:100
  - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
5. Waschen
    - 3 x 10 min in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
  6. DAB-Reaktion
    - Vorsicht DAB ist giftig und krebserregend
    - Immer unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen
    - Mit DAB kontaminierte Abfälle gesondert entsorgen
    - a) DAB-Reaktion (1)
      - 10 min Präinkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
      - i. Ansatz DAB (1):
        - 0,05% DAB
        - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
    - b) DAB-Reaktion (2)
      - ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
      - Die Reaktionszeit richtet sich nach der Intensität der Färbung
      - Wenn die Schnitte eine mittelbraune Färbung zeigen wird die Reaktion abgebrochen
      - ii. Ansatz DAB (2):
        - 0,05% DAB
        - 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
        - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
  7. Abbrechen der DAB-Reaktion / Waschen
    - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  8. Aufziehen der Schnitte
    - Die Schnitte aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einem Pinsel auf Gelatineobjektträger aufziehen, dabei die Reihenfolge der Schnitte beachten
    - Je 6 – 8 Schnitte pro Objektträger
    - Die Schnitte auf dem Trockentisch komplett trocknen lassen
  9. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe
    - Je 2 min in:
      - 1 x Ethanol 50%
      - 1 x Ethanol 70%
      - 1 x Ethanol 96%
      - 2 x Ethanol 100%
      - 3 x Xylol
  10. Eindecken der Schnitte
    - Die Objektträger sofort nach dem Herausnehmen aus der letzten Xylolstufe (die Schnitte dürfen nicht trocknen) mit Entellan eindecken
      - Wenig Entellan genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
    - Pro Objektträger ein Deckglas verwenden

- Überschüssiges Entellan und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
- Die Schnitte über Nacht trocknen lassen

## 6.1.6 Protokoll Gephyrin Immunhistochemie für die Elektronenmikroskopie

### A) Präparation des Gehirns, Anfertigen der Schnitte

#### I. Perfusion

1. Tier mit letaler Dosis Chloralhydrat (5%) betäuben
2. 5 min spülen mit 0,9% NaCl + 0,02% Heparin + 0,02% Lidocain in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. 45 min fixieren mit 4% Paraformaldehyd + 0,4% Glutaraldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Gehirn sofort danach präparieren
5. 4 h bei 4°C nachfixieren in 4% Paraformaldehyd + 0,4% Glutaraldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4
6. Über Nacht waschen bei 4°C in PBS 0,1 mol, pH 7,4

#### II. Anfertigen der Schnitte

1. Trimmen des Gehirns
  - Den Cortex rostral mit einer Skalpellklinge so abschneiden, dass das Stammhirn bei aufrechter Stellung des Gehirns auf der Schnittfläche senkrecht steht.
2. Das Schneiden des Gehirns erfolgt am Vibratom bei Raumtemperatur
3. Einbetten des Gehirns in Agar
  - 5% Agar herstellen und in eine Petrischale gießen
  - Das getrimmte Gehirn senkrecht, mit der abgeschnittenen Cortexfläche nach unten in den noch flüssigen, handwarmen Agar stellen
  - Sobald der Agar völlig erkaltet und fest ist, mit einer Skalpellklinge einen kleinen Agarblock der das Gehirn enthält ausschneiden
  - Agarblock mit Superkleber in die Schneideschale kleben
  - Halbierte Rasierklinge in den Messerhalter am Vibratom einspannen
  - Schneideschale einsetzen und mit gekühltem (4°C) PBS 0,1 mol, pH 7,4 auffüllen, den Agarblock dabei völlig mit Puffer bedecken
  - Puffer in der Schneideschale öfter durch frischen, kalten (4°C) Puffer ersetzen
  - Gehirn sollte immer kühl gehalten werden
4. Schneiden des eingebetteten Gehirns
  - Coronale Schnitte mit einer Schnittdicke von 100 µm anfertigen
  - Die Schnittgeschwindigkeit sollte sehr langsam sein
  - Die Schnitte freischwimmend in kaltem (4°C) PBS 0,1 mol, pH 7,4 auffangen
5. Lagerung der Schnitte
  - Die Schnitte sollten sofort nach dem Schneiden gefärbt werden



- Nicht lagern

## **B) Protokoll der immunhistochemischen Färbung**

### **I. Vorbereitung der Färbung**

1. Auswählen der Schnitte unter dem Mikroskop
  - Prüfen ob die Schnitte intakt sind und ob der SOC erkennbar ist
2. Die Schnitte freischwimmend färben
  - Alle Färbeschritte, bis auf die Antikörperinkubation, in 24-Loch-Zellkulturplatten durchführen
  - Die Antikörperinkubation in 48-Loch-Zellkulturplatten durchführen
  - 1 Schnitt pro Loch verwenden
  - Die Schnitte mit einem Glashaken transportieren
3. Die Flüssigkeitsmenge beträgt 1,0 – 1,5 ml pro Loch für alle Schritte außer der Antikörperinkubationen
4. Bei den Antikörperinkubationen beträgt die Flüssigkeitsmenge 500 µl
5. Alle Schritte werden auf dem Schüttler bei 4°C durchgeführt
6. Bei dieser Färbung darf kein Triton oder ein anderes Detergenz verwendet werden!

### **II. Färbung Tag 1**

1. Waschen (4°C)
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität
  - 10 min Inkubation bei 4°C
    - 10% Methanol + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Waschen (4°C)
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Aufbrechen der Aldehydquervernetzungen am Antigen
  - 30 min Inkubation bei 4°C
    - 0,05 mol Natriumborohydrid in PBS 0,1 mol, pH 7,4 (18,3 mg NaBH<sub>4</sub> in 10 ml PBS)
5. Waschen (4°C)
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
6. Präinkubation
  - 60 min Inkubation bei 4°C
    - 10% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
7. Inkubation primärer Antikörper
  - Min. 16 h Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Die Antikörperlösung auf Eis ansetzen
  - Kontrollschnitt ohne primären Antikörper
    - a) Ansatz für DAB-(EM)-Färbung:

- anti-Gephyrin-Antikörper: 1:100
- 10% NGS
- in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- Ansatz kurz vortexen

### III. Färbung Tag 2

1. Waschen (4°C)
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Inkubation sekundärer Antikörper
  - 3 h Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler
  - Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Die Antikörperlösung auf Eis ansetzen
  - Kontrollschnitt ohne sekundären Antikörper
  - b) Ansatz für DAB-(EM)-Färbung:
    - Ziege-anti-Maus-Biotin: 1:200
    - 2% NGS
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
    - Ansatz kurz vortexen
3. Waschen (4°C)
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Inkubation tertiärer Antikörperkomplex
  - 3 h Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler
  - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen damit sich der ABC-Komplex bilden kann
  - Kontrollschnitt ohne tertiären Antikörperkomplex
  - c) Ansatz ABC-Komplex:
    - ABC-Kit Lösung A: 1:100
    - ABC-Kit Lösung B: 1:100
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
5. Waschen (4°C)
  - 3 x 10 min in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
6. DAB-Reaktion
  - Vorsicht DAB ist giftig und krebserregend
  - Immer unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen
  - Mit DAB kontaminierte Abfälle gesondert entsorgen
  - a) DAB-Reaktion (1)
    - 10 min Präinkubation bei Raumtemperatur(!) auf dem Schüttler
    - i. Ansatz DAB (1):
      - 0,05% DAB
      - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
  - b) DAB-Reaktion (2)

- ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur(!) auf dem Schüttler
- Die Reaktionszeit richtet sich nach der Intensität der Färbung
- Die Reaktion erst abbrechen wenn die Schnitte eine kräftige, dunkelbraune Färbung zeigen
- ii. Ansatz DAB (2):
  - 0,05% DAB
  - 0,01%  $\text{H}_2\text{O}_2$
  - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
- 7. Abbrechen der DAB-Reaktion / Waschen (4°C)
  - 3 x 10 min in PBS 0,1mol, pH 7,4
- 8. Die Schnitte für min. 7 Tage in Glutaraldehydlösung (nach Barnett) im Kühlschrank bei 4°C lagern

### C) Weiterbehandlung der gefärbten Schnitte für die Elektronenmikroskopie

#### I. Einbetten in Araldit

- Vor Beginn prüfen ob alle benötigten Substanzen aufgefüllt sind
- Komponente C für Aralditansatz aus dem Kühlschrank nehmen
- Schritte in kleinen Gläschen durchführen
- 1. Osmifizierung
  - Vorsicht Osmium ist extrem giftig und krebserregend
  - Immer mit Mundschutz und Handschuhen unter dem Abzug arbeiten
  - Entsorgung nur in Sondermüll
  - Wenn die Schnitte weiß (ungefärbt) sind vorher 1 – 2 Tropfen Osmiumlösung (C) in die Gläschen geben, das Material wird dadurch dunkler und daher besser sichtbar
  - 1,5 ml pro Gläschen
    - a) 30 min Inkubation in Dalton-Lösung I bei Raumtemperatur auf dem Schüttler in kleinen Gläschen
      - i. Ansatz Dalton-Lösung I:
        - Lösung A:
          - 4 g Kaliumdichromat
          - ca. 90 ml  $\text{H}_2\text{O}$
          - pH 7,0 mit 1 n KOH (ca. 10 ml) einstellen
        - Lösung B:
          - 3,4% NaCl in  $\text{H}_2\text{O}$
        - Lösung C:
          - 2% Osmiumtetroxid in  $\text{H}_2\text{O}$
        - Mischungsverhältnis:
          - A : B : C = 1 : 1 : 2 (Osmium immer doppelte Menge)
- 2. Entwässerung
  - Große Schnitte auf dem Schüttler entwässern
  - Vorsicht Propylenoxid (1,2-Epoxypropan) ist extrem flüchtig, hochentzündlich, sehr giftig und krebserregend
  - Bei Propylenoxid immer mit Handschuhen und Mundschutz unter dem Abzug arbeiten

- Verdünnungen aus Ethanol absolut (reinst, mit Molekularsieb) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> herstellen
  - 30% Ethanol für 10 min
  - 50% Ethanol für 10 min
  - 70% Ethanol für 20 min
  - 96% Ethanol für 20 min
  - 100% Ethanol für 20 min
  - 100% Ethanol + Propylenoxid (1:1) für 20 min
- 3. Inkubation in Propylenoxid und Araldit
  - Propylenoxid für 20 min
  - Propylenoxid + Araldit (1:1) für 20 min
- 4. Einbetten in Araldit
  - Mengenangaben der Ansätze reichen für 10 Gläschen, wenn mehr Gläschen verwendet werden doppelte Menge ansetzen
  - a) Araldit I
    - Über Nacht bei Raumtemperatur in den offenen Gläschen inkubieren
    - Araldit I muss in einem Becherglas angesetzt werden wenn man die Blöckchen in 100% Ethanol gibt
    - Den Araldit I Ansatz 1 h rühren
    - i. Ansatz Araldit I:
      - Komponente A: 10 g
      - Komponente B: 10 g
      - Komponente C: 0,3 g (mit Pasteurpipette zugeben)
      - Komponente D: 0,3 g (mit Pasteurpipette zugeben)
  - b) Ausgießen der Blöckchen
    - Den Araldit Ansatz 1 h rühren
    - ii. Ansatz Araldit zum Ausgießen:
      - Komponente A: 10 g
      - Komponente B: 10 g
      - Komponente C: 0,4 g (mit Pasteurpipette zugeben)
      - Komponente D: 0,3 g (mit Pasteurpipette zugeben)
  - c) Polymerisation des Araldits
    - Zwei Tage bei 40°C im Inkubator
    - Einen Tag bei 60°C im Inkubator

## II. Trimmen der Blöckchen

- Die Blöckchen mit einer Säge und einer starken Klinge zu einer stumpfen, flachen Pyramide mit trapezförmiger Grundfläche trimmen
- Der Winkel der Seitenflächen sollte ca. 45° betragen
- Die Seitenflächen sollten glatt und ohne Wellen sein
- Anschnittfläche mit Ethanol reinigen

**III. Anfertigen der Semi- und Ultradünnschnitte**

- Die Schnitte mit einem Diamantmesser an einem Ultramikrotom anfertigen
- Schälchen des Diamantmessers mit Wasser füllen
- Den Diamanten nicht berühren oder beschädigen!
- Die Semidünnschnitte mit einem Holzstäbchen in eine Petrischale mit  $H_2O$  transferieren
- Bei einer Schnittdicke von 50 – 100 nm sollten die Ultradünnschnitte, wenn sie nach dem Schneiden auf der Wasseroberfläche schwimmen, durch die Reflexion des Lichtes eine silbrig-graue bis goldene Farbe haben
- Die Ultradünnschnitte mit einer Wimper auf Formvar beschichtete Nickel-Einlochgrids aufziehen, dabei die sehr feine Formvarschicht nicht zerstören
- Die Nickelgrids in speziellen Gridplatten lagern, dabei auf die Reihenfolge und Beschriftung achten

**IV. Gegenfärbung der Semidünnschnitte**

- Die Semidünnschnitte mit der Richardson-Färbung gegenfärben
1. Aufziehen der Schnitte
    - Auf unbeschichtete Objektträger aufziehen
    - Die Schnitte auf einen Tropfen  $H_2O$  auf dem Objektträger geben
    - Auf der Wärmeplatte antrocknen lassen
  2. Färben in Mallorys Azur II-Methylenblau-Lösung
    - Die Färbung auf der Wärmeplatte bei ca. 70°C durchführen
    - Die Schnitte ca. 4 min durch Auftropfen der Lösung färben
    - Die Lösung nach dem Ansetzen durch Filterpapier filtrieren
    - Die Lösung ist für einige Zeit haltbar
      - i. Ansatz Azur II-Methylenblau-Lösung:
        - 1% Azur II in  $H_2O$
        - 1% Methylenblau in 1% Natriumtetraborat Lösung
        - beide Lösungen 1:1 mischen
        - 40% Saccharose
        - einige Tropfen 4% Formollösung zugeben
        - z.B.: 100 ml Azur II Lösung  
100 ml Methylenblaulösung  
80 g Saccharose  
1 – 9 Tropfen Formollösung
  3. Abbrechen der Färbung
    - Die Farbe abgießen
    - Die Schnitte 3x für einige Minuten in  $H_2O$  spülen
  4. Schnitte auf der Wärmeplatte trocknen lassen
  5. Eindecken der Schnitte
    - Die Schnitte mit Paraffinöl eindecken und mit Eukitt umranden

**V. Kontrastierung der Ultradünnschnitte**

- Mit Uranylacetat und Bleicitrat

**D) Ansatz für 2% Glutaraldehydlösung nach Barnett****I. Neutralisieren des Glutaraldehyds**

- 12,5 g Aktivkohle
- 100 ml 25% Glutaraldehydlösung
- beides mischen
- filtrieren

**II. Ansatz für 250 ml 2% Glutaraldehydlösung nach Barnett:**

- 20 ml der neutralisierten 25% Glutaraldehydlösung
- 2,637 g Natriumcacodylat
- 12,39 g D-Glucose-monohydrat
- auf 250 ml mit H<sub>2</sub>O auffüllen
- pH 7,4 mit HNO<sub>3</sub> konz. einstellen
- Mit HNO<sub>3</sub> konz. nur unter dem Abzug arbeiten, Handschuhe und Schutzbrille tragen

## **6.1.7 Protokoll Glycinfärbung (Vibratonschnitte)**

### **[DAB-Färbung]**

**A) Präparation des Gehirns, Anfertigen und Lagern der Schnitte****I. Perfusion**

1. Tier mit letaler Dosis Chloralhydrat (5%) betäuben
2. 5 min spülen mit 0,9% NaCl + 0,02% Heparin + 0,02% Lidocain in PBS 0,05 mol, pH 7,4
3. 45 min fixieren mit 1% Paraformaldehyd + 2,5% Glutaraldehyd + 1% Natriumdisulfit in PBS 0,05 mol, pH 7,4
4. Das Gehirn sofort danach präparieren
5. 5 h bei 4°C nachfixieren in 1% Paraformaldehyd + 2,5% Glutaraldehyd + 1% Natriumdisulfit in PBS 0,05 mol, pH 7,4
6. Über Nacht waschen bei 4°C in PBS 0,1 mol, pH 7,4

**II. Anfertigen der Schnitte**

1. Trimmen des Gehirns
  - Den Cortex rostral mit einer Skalpellklinge so abschneiden, dass das Stammhirn bei aufrechter Stellung des Gehirns auf der Schnittfläche senkrecht steht.
2. Das Schneiden des Gehirns erfolgt am Vibratom bei Raumtemperatur
3. Einbetten des Gehirns in Agar
  - 5% Agar herstellen und in eine Petrischale gießen
  - Das getrimmte Gehirn senkrecht, mit der abgeschnittenen Cortexfläche nach unten in den noch flüssigen, handwarmen Agar stellen
  - Sobald der Agar völlig erkaltet und fest ist mit einer Skalpellklinge einen kleinen Agarblock der das Gehirn enthält ausschneiden
  - Agarblock mit Superkleber in die Schneideschale kleben
  - Halbierete Rasierklinge in den Messerhalter am Vibratom einspannen

- Schneideschale einsetzen und mit TBM-Puffer auffüllen, den Agarblock dabei völlig mit Puffer bedecken
- 4. Schneiden des eingebetteten Gehirns
  - Coronale Schnitte mit einer Schnittdicke von 30 µm anfertigen
  - Die Schnittgeschwindigkeit sollte sehr langsam sein
  - Die Schnitte freischwimmend in TBM-Puffer auffangen
- 5. Lagerung der Schnitte
  - Die Schnitte können über Nacht bei 4°C in TBM-Puffer aufbewahrt werden
  - Nicht länger lagern

## **B) Protokoll der immunhistochemischen Färbung**

### **I. Vorbereitung der Färbung**

1. Auswählen der Schnitte unter dem Mikroskop
  - Prüfen ob die Schnitte intakt sind und ob der SOC erkennbar ist
2. Die Schnitte freischwimmend färben
  - Die Färbung in 24-Loch-Zellkulturplatten durchführen
  - 4 Schnitte pro Loch verwenden
  - Die Schnitte mit einem Glashaken transportieren
3. Die benötigte Flüssigkeitsmenge beträgt mindestens 500 µl pro Loch, für alle Schritte außer der Antikörperinkubation ist es besser die Flüssigkeitsmenge auf 1,0 – 1,5 ml zu erhöhen.
4. Alle Schritte werden auf dem Schüttler und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **II. Färbung Tag 1**

1. Waschen
  - 3 x 10 min in TBM-Puffer
2. Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität
  - 10 min Inkubation
    - 10% Methanol + 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in TBM-Puffer
3. Waschen
  - 3 x 10 min in TBM-Puffer
4. Aufbrechen der Aldehydquervernetzungen am Antigen
  - 10 min Inkubation
    - 0,1 mol Natriumborohydrid in TBM-Puffer (38 mg NaBH<sub>4</sub> in 10 ml TBM)
5. Waschen
  - 4 x 10 min in TBM-Puffer
6. Präinkubation
  - a) 60 min Inkubation
    - 0,3% Triton x 100 + 10% NGS in TBM-Puffer
  - b) 10 min Inkubation
    - 0,3% Triton x 100 + 2% NGS in TBM-Puffer

7. Inkubation primärer Antikörper
  - Min. 12 h Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Die Antikörperlösung auf Eis ansetzen
  - Kontrollschnitte ohne primären Antikörper
    - a) Ansatz für DAB-Färbung:
      - anti-Glycin-Antikörper: 1:15000
      - 2% NGS
      - in TBM-Puffer
      - Ansatz kurz vortexen

### III. Färbung Tag 2

1. Waschen
  - 4 x 10 min in TBS-Puffer
2. Inkubation sekundärer Antikörper
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Kontrollschnitte ohne sekundären Antikörper
    - b) Ansatz für DAB Färbung:
      - Ziege-anti-Kaninchen-Biotin: 1:200
      - 2% NGS
      - in TBS-Puffer
      - Ansatz kurz vortexen
3. Waschen
  - 3 x 10 min in TBS-Puffer
4. Inkubation tertiärer Antikörperkomplex
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen damit sich der ABC-Komplex bilden kann
  - Kontrollschnitte ohne tertiären Antikörperkomplex
    - c) Ansatz ABC-Komplex:
      - ABC-Kit Lösung A: 1:100
      - ABC-Kit Lösung B: 1:100
      - in TBS-Puffer
5. Waschen
  - 3 x 10 min in TBS-Puffer
6. DAB-Reaktion
  - Vorsicht DAB ist giftig und krebserregend
  - Immer unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen
  - Mit DAB kontaminierte Abfälle gesondert entsorgen
    - a) DAB-Reaktion (1)



- 10 min Präinkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - i. Ansatz DAB (1):
    - 0,05% DAB
    - in TBS-Puffer
  - b) DAB-Reaktion (2)
    - ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
    - Die Reaktionszeit richtet sich nach der Intensität der Färbung
    - Wenn die Schnitte eine mittelbraune Färbung zeigen wird die Reaktion abgebrochen
  - ii. Ansatz DAB (2):
    - 0,05% DAB
    - 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
    - in TBS-Puffer
- 7. Abbrechen der DAB-Färbung / Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 8. Aufziehen der Schnitte
  - Die Schnitte aus H<sub>2</sub>O mit einem Pinsel auf Gelatineobjektträger aufziehen, dabei die Reihenfolge der Schnitte beachten.
  - Je 6 – 8 Schnitte pro Objektträger
  - Die Schnitte auf dem Trockentisch komplett trocknen lassen
- 9. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe
  - Je 2 min in:
    - 1 x Ethanol 50%
    - 1 x Ethanol 70%
    - 1 x Ethanol 96%
    - 2 x Ethanol 100%
    - 3 x Xylol
- 10. Eindecken der Schnitte
  - Die Objektträger sofort nach dem Herausnehmen aus der letzten Xylolstufe (die Schnitte dürfen nicht trocknen) mit Entellan eindecken
    - Wenig Entellan genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
  - Pro Objektträger ein Deckglas verwenden
  - Überschüssiges Entellan und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
  - Die Schnitte über Nacht trocknen lassen

**C) Spezielle Puffer für die Glycinfärbung an Vibratomschnitten****I. TBM-Puffer**

- a) Ansatz für 2 Liter Puffer:
  1. 0,05 mol Tris-HCl
    - 12,7 g Trizma-HCl
    - 2,36 g Trizma-Base
  2. 0,85% Natriumdisulfit
    - 17 g Natriumdisulfit
  3. pH 7,5 mit 1 molarer HCl einstellen

**II. TBS-Puffer**

- b) Ansatz für 2 Liter Puffer:
  1. 0,05 mol Tris-HCl
    - 12,7 g Trizma-HCl
    - 2,36 g Trizma-Base
  2. 0,85% NaCl
    - 17 g NaCl
  3. pH 7,5 mit 1 mol HCl einstellen

### **6.1.8 Protokoll MAP2-Färbung (Gefrierschnitte) [Fluoreszenz- oder DAB-Färbung]**

**A) Präparation des Gehirns, Anfertigen und Lagern der Schnitte****I. Perfusion**

1. Tier mit letaler Dosis Chloralhydrat (5%) betäuben
2. 5 min spülen mit 0,9% NaCl + 0,02% Heparin + 0,02% Lidocain in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. 30 min fixieren mit 4% Paraformaldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Das Gehirn sofort danach präparieren
5. 60 min bei 4°C nachfixieren in 4% Paraformaldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4
6. 2 x 30 min bei 4°C waschen in PBS 0,1 mol, pH 7,4

**II. Kryoprotektion**

1. 2 h in 10% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. 20% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4 bis zum Absinken des Gehirns
3. 30% Saccharose in PBS 0,1 mol, pH 7,4 über Nacht oder bis zum Absinken des Gehirns in der Zuckerlösung

**III. Anfertigen der Schnitte**

1. Trimmen des Gehirns
  - Den Cortex rostral mit einer Skalpellklinge so abschneiden, dass das Stammhirn bei aufrechter Stellung des Gehirns auf der Schnittfläche senkrecht steht.

2. Das Schneiden des Gehirns erfolgt im Kryostaten bei  $-20^{\circ}\text{C}$  oder am Gefrierschlittenmikrotom
3. Das Gehirn auf einen Metallblock im Kryostaten oder auf das Peltierelement am Gefrierschlittenmikrotom auffrieren
  - Einen Tropfen TissueTec auf den kalten Metallblock oder das Peltierelement geben und frieren lassen
  - Den TissueTec Tropfen plan schneiden
  - Einen weiteren Tropfen TissueTec auf die plane Fläche geben
  - Das getrimmte Gehirn mit der abgeschnittenen Cortexfläche senkrecht in den Tropfen stellen und festfrieren lassen
  - Das Gehirn vollständig mit vorgekühltem TissueTec bedecken und komplett einfrieren
4. Schneiden des eingebetteten Gehirns
  - Coronale Schnitte mit einer Schnittdicke von  $25\text{ }\mu\text{m}$  anfertigen
  - Die Schnitte freischwimmend in PBS  $0,1\text{ mol}$ ,  $\text{pH } 7,4$  auffangen
5. Lagerung der Schnitte
  - Die Schnitte können für einige Monate in Frostschutzlösung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden

## **B) Protokoll der immunhistochemischen Färbung**

### **I. Vorbereitung der Färbung**

1. Entnehmen der Schnitte aus der Frostschutzlösung
  - $3 \times 10\text{ min}$  waschen in PBS  $0,1\text{ mol}$ ,  $\text{pH } 7,4$
2. Auswählen der Schnitte unter dem Mikroskop
  - Prüfen ob die Schnitte intakt sind und ob der SOC erkennbar ist
3. Die Schnitte freischwimmend färben
  - Die Färbung in 24-Loch-Zellkulturplatten durchführen
  - 4 Schnitte pro Loch verwenden
  - Die Schnitte mit einem Glashaken transportieren
4. Die benötigte Flüssigkeitsmenge beträgt mindestens  $500\text{ }\mu\text{l}$  pro Loch, für alle Schritte außer den Antikörperinkubationen ist es besser die Flüssigkeitsmenge auf  $1,0 - 1,5\text{ ml}$  zu erhöhen.
5. Alle Schritte werden auf dem Schüttler und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt.

### **II. Färbung Tag 1**

1. Waschen
  - $3 \times 10\text{ min}$  in PBS  $0,1\text{ mol}$ ,  $\text{pH } 7,4$
2. Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität
  - $10\text{ min}$  Inkubation
    - $10\%$  Methanol +  $3\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS  $0,1\text{ mol}$ ,  $\text{pH } 7,4$
3. Waschen
  - $3 \times 10\text{ min}$  in PBS  $0,1\text{ mol}$ ,  $\text{pH } 7,4$
4. Präinkubation

- 60 min Inkubation
  - 0,5% Triton x 100 + 10% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 5. Inkubation primärer Antikörper
  - Min. 12 h Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Die Antikörperlösung auf Eis ansetzen
  - Kontrollschnitte ohne primären Antikörper
    - a) Ansatz für Fluoreszenz und DAB-Färbung:
      - anti-MAP2-Antikörper: 1:250
      - 0,5% Triton x 100
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen

### III. Färbung Tag 2

#### A) Fluoreszenzfärbung (Schnitte immer dunkel halten)

1. Waschen
    - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  2. Inkubation sekundärer Antikörper
    - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln
    - Die Antikörperaliquots lichtgeschützt auftauen lassen und kurz zentrifugieren
    - Kontrollschnitte ohne sekundären Antikörper
      - a) Ansatz Fluoreszenzfärbung:
        - Ziege-anti-Maus-Cy3: 1:500
        - 0,5% Triton x 100
        - 2% NGS
        - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
        - Ansatz kurz vortexen
  3. Waschen (dunkel)
    - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  4. Markierung der Lage der Somata (evtl. durchführen)
    - a) 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln
      - DAPI: 1:1000
      - 0,5% Triton x 100
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen
- oder
- b) Fluoreszente Nisslfärbung
    - 20 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln
    - NeuroTrace Fluorescent Nissl Stain: 1:300
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4

- Ansatz kurz vortexen
- 5. Waschen [nur wenn Punkt 4. durchgeführt wurde] (dunkel)
  - Nach DAPI-Inkubation:
    - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  - Nach fluoreszenter Nisslfärbung:
    - 6 x 20 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 6. Aufziehen der Schnitte (lichtgeschützt)
  - Die Schnitte aus H<sub>2</sub>Odd mit einem Pinsel auf Gelatineobjektträger aufziehen, dabei die Reihenfolge der Schnitte beachten
  - Je 2 Schnitte pro Objektträger
  - Die Schnitte nur leicht antrocknen lassen. Nicht voll trocknen lassen sonst entsteht unspezifische Hintergrundfärbung.
- 7. Eindecken der Schnitte (lichtgeschützt)
  - Mit Gel/Mount oder anderem anti-fading Einbettmedium eindecken
    - Ein Tropfen Gel/Mount pro Schnitt genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte möglichst dünn sein
  - Pro Schnitt ein Deckglas verwenden
  - Überschüssiges Gel/Mount und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
  - Die Schnitte trocknen lassen und bei 4°C dunkel lagern

#### B) DAB-Färbung

1. Waschen
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Inkubation sekundärer Antikörper
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - Die Antikörperaliquots auftauen lassen und kurz zentrifugieren
  - Kontrollschnitte ohne sekundären Antikörper
    - b) Ansatz DAB-Färbung:
      - Ziege-anti-Maus-Biotin: 1:300
      - 0,5% Triton x 100
      - 2% NGS
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen
3. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Inkubation tertiärer Antikörperkomplex
  - 60 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen damit sich der ABC-Komplex bilden kann
  - Kontrollschnitte ohne tertiären Antikörperkomplex

- c) Ansatz ABC-Komplex:
  - ABC-Kit Lösung A: 1:100
  - ABC-Kit Lösung B: 1:100
  - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 5. Waschen
  - 3 x 10 min in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
- 6. DAB-Reaktion
  - Vorsicht DAB ist giftig und krebserregend
  - Immer unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen
  - Mit DAB kontaminierte Abfälle gesondert entsorgen
  - a) DAB-Reaktion (1)
    - 10 min Präinkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
    - i. Ansatz DAB (1):
      - 0,05% DAB
      - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
    - b) DAB-Reaktion (2)
      - ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
      - Die Reaktionszeit richtet sich nach der Intensität der Färbung
      - Wenn die Schnitte eine mittelbraune Färbung zeigen wird die Reaktion abgebrochen
      - ii. Ansatz DAB (2)
        - 0,05% DAB
        - 0,01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
        - in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
- 7. Abbrechen der DAB-Reaktion / Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
- 8. Aufziehen der Schnitte
  - Die Schnitte aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einem Pinsel auf Gelatineobjektträger aufziehen, dabei die Reihenfolge der Schnitte beachten
  - Je 6 – 8 Schnitte pro Objektträger
  - Die Schnitte auf dem Trockentisch komplett trocknen lassen
- 9. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe
  - Je 2 min in:
    - 1 x Ethanol 50%
    - 1 x Ethanol 70%
    - 1 x Ethanol 96%
    - 2 x Ethanol 100%
    - 3 x Xylol
- 10. Eindecken der Schnitte
  - Die Objektträger sofort nach dem Herausnehmen aus der letzten Xylolstufe (die Schnitte dürfen nicht trocknen) mit Entellan eindecken

- Wenig Entellan genügt, die Schicht des Einbettmediums sollte eher dünn sein
- Pro Objektträger ein Deckglas verwenden
- Überschüssiges Entellan und eventuelle Luftblasen durch vorsichtiges Drücken mit der Objektträgerpinzette auf das Deckglas herausquetschen, dabei den Schnitt nicht zerstören!
- Die Schnitte über Nacht trocknen lassen

### 6.1.9 Protokoll Neurobiotin-Färbung [Fluoreszenz- oder DAB-Färbung]

#### A) Füllen von Zellen in Hirnschnitten bei der *in vitro* Elektrophysiologie und Fixierung der Hirnschnitte

##### I. Konzentration Neurobiotin oder Biocytin

1. Bei PCL-Ableitungen (patch-clamp)
  - 0,2% Neurobiotin / Biocytin in der internen Elektrodenlösung
2. Bei Ableitungen mit scharfen Elektroden
  - 2% Neurobiotin / Biocytin in 2 mol Kaliumacetat Lösung

##### II. Füllen der Zellen

1. Bei PCL-Ableitungen
  - Die Zellen füllen sich automatisch während der Ableitung durch Vermischung der internen Elektrodenlösung mit dem Cytoplasma der Zelle
  - Die Zelle ca. 30 min füllen lassen, dann die Elektrode vorsichtig und langsam zurückziehen um die Zelle nicht zu beschädigen
  - Vor der Fixierung den Hirnschnitt noch ca. 15 min in oxygenierter ACSF liegen lassen
2. Bei Ableitungen mit scharfen Elektroden
  - Das Neurobiotin durch Anlegen von 150 ms langen Rechteckpulsen mit einer Stromstärke von 1 – 5 nA und einer Wiederholrate von 3,3 Hz für 10 min in die Zelle injizieren
  - Vor der Fixierung den Hirnschnitt noch ca. 1 h in oxygenierter ACSF liegen lassen

##### III. Fixierung der Hirnschnitte

1. Den Hirnschnitt mit einer umgedrehten Pasteurpipette aus der ACSF nehmen und in 4% Paraformaldehyd in PBS 0,1 mol, pH 7,4 legen
2. Den Hirnschnitt bei 4°C für mindestens 5 Tage fixieren lassen

#### B) Protokoll der immunhistochemischen Färbung

##### I. Vorbereitung

1. Die Hirnschnitte werden nicht geschnitten, die Färbung der Zellen erfolgt im ganzen Schnitt
2. Die Hirnschnitte mit einem Glashaken aus dem Fixativ nehmen
  - 4 x 15 min waschen in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Die Hirnschnitte freischwimmend färben

- Die Färbung in 24-Loch-Zellkulturplatten durchführen
  - 1 Hirnschnitt pro Loch verwenden
  - Die Schnitte mit einem Glashaken transportieren
4. Die benötigte Flüssigkeitsmenge beträgt mindestens 1,0 ml pro Schritt, zum Waschen kann die Flüssigkeitsmenge auf 2,0 ml erhöht werden
  5. Alle Schritte werden auf dem Schüttler und wenn nicht anders angegeben bei Raumtemperatur durchgeführt

## II. Färbung Tag 1

1. Zerstörung der endogenen Peroxidaseaktivität
  - 15 min Inkubation
    - 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Waschen
  - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Permeabilisieren des Gewebes
  - Min. 12 h Inkubation bei 4°C auf dem Schüttler
    - 3% Triton x 100 in PBS 0,1 mol, pH 7,4

## III. Färbung Tag 2

### A) Fluoreszenzfärbung (Hirnschnitte immer dunkel halten)

1. Waschen
  - 1 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Präinkubation
  - 2 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
    - 2% Triton x 100 + 5% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Inkubation Fluoreszenzantikörper
  - 2 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln
  - Die Antikörperaliquots lichtgeschützt auftauen lassen und kurz zentrifugieren
    - a) Ansatz Fluoreszenzfärbung:
      - Streptavidin-Cy3: 1:800
      - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
      - Ansatz kurz vortexen
4. Waschen (dunkel)
  - 4 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
5. Markierung der Lage der Zellen im Kerngebiet (evtl. durchführen)
  - a) 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln
    - DAPI: 1:1000
    - 0,5% Triton x 100
    - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
    - Ansatz kurz vortexen
  - oder
  - b) Fluoreszente Nisslfärbung



- 20 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler im Dunkeln
  - NeuroTrace Fluorescent Nissl Stain: 1:350
  - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  - Ansatz kurz vortexen
6. Waschen [nur wenn Punkt 4. durchgeführt wurde] (dunkel)
    - Nach DAPI-Inkubation:
      - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
    - Nach fluoreszenter Nisslfärbung:
      - 6 x 20 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  7. Aufziehen der Schnitte (lichtgeschützt)
    - Die Schnitte aus H<sub>2</sub>Odd mit einem Pinsel auf Gelatineobjektträger aufziehen
    - Je 1 Hirnschnitt pro Objektträger
  8. Den Hirnschnitt so legen, dass die gefärbte Zelle gut zu sehen ist
    - Den Hirnschnitt im Fluoreszenzmikroskop betrachten und sicherstellen, dass die Zelle zu erkennen ist, den Hirnschnitt dazu evtl. umdrehen
    - Um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern 1 – 2 Tropfen Gel/Mount auf den Hirnschnitt geben.
    - Den Hirnschnitt bei der Untersuchung im Mikroskop nicht austrocknen lassen, sofort danach eindecken
  9. Eindecken der Schnitte (lichtgeschützt)
    - Mit Gel/Mount oder anderem anti-fading Einbettmedium eindecken
    - Pro Hirnschnitt ein Deckglas verwenden
    - Das Deckglas sehr vorsichtig auf den Hirnschnitt legen, damit dieser nicht wegschwimmt und sich keine Luftblasen bilden
    - Das Deckglas leicht andrücken und am Rand mit Gel/Mount auffüllen
      - Das gesamte Deckglas sollte mit Gel/Mount gefüllt sein
  10. Schnitte trocknen lassen und bei 4°C dunkel lagern

#### B) DAB-Färbung

1. Waschen
  - 1 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
2. Präinkubation
  - 2 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
    - 0,5% Triton x 100 + 5% NGS in PBS 0,1 mol, pH 7,4
3. Inkubation ABC-Antikörperkomplex
  - 2 h Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
  - Die Lösung 30 min vor Gebrauch ansetzen und auf dem Schüttler stehen lassen damit sich der ABC-Komplex bilden kann
  - b) Ansatz ABC-Komplex:
    - ABC-Kit Lösung A: 1:100
    - ABC-Kit Lösung B: 1:100
    - 0,5% Triton x 100

- 5% NGS
  - in PBS 0,1 mol, pH 7,4
4. Waschen
    - 3 x 10 min in Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
  5. DAB-Reaktion mit Nickelverstärkung
    - Vorsicht DAB ist giftig und krebserregend
    - Immer unter dem Abzug arbeiten und Handschuhe tragen
    - Mit DAB kontaminierte Abfälle gesondert entsorgen
    - a) DAB-Reaktion mit Nickelverstärkung (1)
      - 10 min Präinkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
      - i. Ansatz DAB mit Nickelverstärkung (1):
        - 5 mg DAB
        - 100 µl einer 1M Imidazolösung
        - in 10 ml Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
      - b) DAB Reaktion mit Nickelverstärkung (2)
        - ca. 10 min Inkubation bei Raumtemperatur auf dem Schüttler
        - Die Reaktionszeit richtet sich nach der Intensität der Färbung
        - Wenn die Zellen eine dunkelbraune bis schwarze Färbung zeigen wird die Reaktion abgebrochen
        - ii. Ansatz DAB mit Nickelverstärkung (2):
          - 5 mg DAB
          - 100 µl einer 1M Imidazolösung
          - 1 ml einer 3% Nickelammoniumsulfatlösung
          - 5 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
          - in 10 ml Tris-Puffer 0,05 mol, pH 7,4
  6. Abbrechen der DAB-Reaktion / Waschen
    - 3 x 10 min in PBS 0,1 mol, pH 7,4
  7. Aufziehen der Schnitte
    - Die Hirnschnitte aus H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einem Pinsel auf Gelatineobjektträger aufziehen
    - Je 1 Hirnschnitt pro Objektträger
    - Den Hirnschnitt im Mikroskop betrachten und sicherstellen dass die Zelle zu erkennen ist, den Hirnschnitt dazu evtl. umdrehen
    - Die Hirnschnitte auf dem Trockentisch komplett trocknen lassen
  8. Entwässern der Schnitte in der Alkoholreihe
    - Je 2 min in:
      - 1 x Ethanol 50%
      - 1 x Ethanol 70%
      - 1 x Ethanol 96%
      - 2 x Ethanol 100%
      - 3 x Xylol
  9. Eindecken der Schnitte

- Die Objektträger sofort nach dem Herausnehmen aus der letzten Xylolstufe (die Hirnschnitte dürfen nicht trocknen) mit Entellan eindecken
- Pro Hirnschnitt ein Deckglas verwenden
- Das Deckglas leicht andrücken um Luftblasen zu entfernen und am Rand mit Entellan auffüllen
  - Das gesamte Deckglas sollte mit Entellan gefüllt sein
- Die Hirnschnitte über Nacht trocknen lassen

## **6.2 Liste der verwendeten Reagenzien**

In den folgenden Listen sind die Chemikalien, Reagenzien und Verbrauchsmittel, die nicht bereits in Kapitel 3 (Material und Methoden) mit ihren Bezugsquellen angegeben wurden, aufgeführt.

### **6.2.1 Allgemeine Chemikalien**

Ascorbinsäure-L(+) (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Bleicitrat-trihydrat (Fluka, Deisenhofen, Deutschland)  
 Calciumcarbonat-dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Ethylenglycol (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Formaldehyd 37%ige Lösung (Formol; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Glucose-D(+) Monohydrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Glucose-D(+) wasserfrei (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Glutaraldehyd 25%ige Lösung (Serva, Heidelberg, Deutschland)  
 Glycerin 85%ige Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Imidazol (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Isopentan (2-Methylbutan; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Kaliumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Kaliumchlorid (KCl; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Kaliumdichromat (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Kalium-dihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Kaliumhydroxid (KOH; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ ; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Magnesiumsulfat-heptahydrat ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Natriumborohydrid ( $\text{NaBH}_4$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Natriumcacodylat-trihydrat (Fluka, Deisenhofen, Deutschland)  
 Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Natrium-dihydrogenphosphat-monohydrat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Natriumdisulfit (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Natriumhydroxid (NaOH; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Natriumtetraborat (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Nickelammoniumsulfat (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Osmiumtetroxid 2%ige Lösung (Fluka, Deisenhofen, Deutschland)  
 Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol; Fluka, Deisenhofen, Deutschland)  
 Propylenoxid (1,2-Epoxypropan; Fluka, Deisenhofen, Deutschland)

Saccharose (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Salpetersäure (HNO<sub>3</sub>; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Salzsäure (HCl; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Trizma-Base (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Trizma-Hydrochlorid (Trizma-HCl; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Uranylacetat-dihydrat (Fluka, Deisenhofen, Deutschland)  
 Wasser doppelt deionisiert (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>; Seral, Ransbach-Baumbach, Deutschland)  
 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Xylol (Merck, Darmstadt, Deutschland)

### 6.2.2 Standardpuffer für die Immunhistochemie

Puffer	Ansatz für 10l
PBS (phosphat-gepufferte Saline) 0,1 mol pH 7,4	KCl (2,6 mM) 2,0 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,4 mM) 2,0 g NaCl (136 mM) 80 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O (8 mM) 14,4 g in 10l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH einstellen mit 10n NaOH und HCl konz.
Tris-Puffer 0,05 mol pH 7,4	Trizma-HCl (40 mM) 63,5 g Trizma-Base (10 mM) 11,8g in 10l H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH einstellen mit 10n NaOH und HCl konz.

### 6.2.3 Sonstige Reagenzien und Verbrauchsmittel

Aktivkohle (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Azur II (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 Chloralhydrat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Einloch-Nickelgrids (Science Services, München, Deutschland)  
 Eukitt (Fluka, Deisenhofen, Deutschland)  
 Formwar (Fluka, Deisenhofen, Deutschland)  
 Filterpapier (Schleicher & Schuell, Dassel; Deutschland)  
 Heparin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 LB-Agar (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Lidocain (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Methyleneblau (Merck, Darmstadt, Deutschland)  
 PAP-Pen (DAKO, Hamburg, Deutschland)  
 Paraffinöl (Lamotte, Bremen, Deutschland)  
 Parafilm (American National Can, Menasha, WI, USA)  
 Superkleber (UHU, Bühl, Deutschland)  
 TissueTec OCT Compound (Sakura, Zouterwoude, Niederlande)  
 Triton x 100 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Tween 20 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Zellkulturplatten (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)

### 6.2.4 Fixiermittel

Fixiermittel	Ansatz
Paraformaldehyd 4% in PBS	40 g Paraformaldehyd in 1000 ml PBS lösen auf 60°C erwärmen und einige Tropfen NaOH (1 mol) zugeben, bis die Lösung klar ist. Lösung auf Eis abkühlen und durch einen 0,2 µm Filter filtrieren.
Formaldehyd 37%ige Lösung (Formol) Glutaraldehyd 25%ige Lösung	

## 6.2.5 Spezielle Chemikalien für die *in vitro* Elektrophysiologie

Cäsiumchlorid (CsCl; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Cäsiumhydroxid (CsOH; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Cäsiummethylsulfonat (CsMeSO<sub>4</sub>; Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 EGTA (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 HEPES (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Kaliumgluconat (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Magnesium-ATP (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Natrium-ATP (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Natrium-GTP (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)  
 Natrium-Phosphocreatin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

## 6.2.6 Liste der Pharmaka für die *in vitro* Elektrophysiologie

Abkürzung	Vollständige chemische Bezeichnung	Konzentration	Hersteller
Cäsiumsalze	Cäsiumchlorid (CsCl) oder Cäsium-methylsulfonat (CsMeSO <sub>4</sub> )	125 – 140 mM	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
CNQX	6-Cyano-7-nitroquin oxaline-2,3-dione disodium	10 µM	Tocris-Cookson, Bristol, UK
D-APV	D-(-)-2-Amino-5-phosphono pentatonic acid	50 µM	Tocris-Cookson, Bristol, UK
5,7-dichloro kynurenic acid	5,7-Dichloro-4-hydroxyquinoline-2-carboxylic acid	5 µM	Tocris-Cookson, Bristol, UK
DNQX	6,7-dinitroquin oxaline-2,3-dione	10 µM	Tocris-Cookson, Bristol, UK
Gabazine (SR 95531 hydrobromide)	6-Imino-3-(4-methoxyphenyl)-1(6 <i>H</i> )-pyridazinebutanoic acid hydrobromide	3 µM	Tocris-Cookson, Bristol, UK
Kynurensäure	4-Hydroxyquinoline-2-carboxylic acid	5 mM	Fluka, Deisenhofen, Deutschland
(+)MK 801 maleate	5 <i>S</i> ,10 <i>R</i> -(+)-5-Methyl-10,11-dihydro-5 <i>H</i> -dibenzo[ <i>a,d</i> ]cyclohepten-5,10-imine maleate	5 µM	Tocris-Cookson, Bristol, UK
NBQX	2,3-Dioxo-6-nitro-1,2,3,4-tetrahydrobenzo[ <i>f</i> ]quinoxaline-7-sulfonamide disodium	5 µM	Tocris-Cookson, Bristol, UK
QX 314	Lidocain N-Ethylbromide	5 mM	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Strychnin	Strychnin-hydrochlorid	0,5 µM	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ZD7288	4-Ethylphenylamino-1,2-dimethylaminopyrimidinium chloride	5 µM	Tocris-Cookson, Bristol, UK

## 7 Liste der Abkürzungen und Begriffe

VIII-Nerv	achter Gehirnnerv, Nervus Acousticus
$\tau_{\text{dec}}$	Zeitkonstante des exponentiellen Abklingens
$\tau_{\text{Membran}}$	Membranzeitkonstante; Zeit bis 63% der maximalen Amplitude der Spannung erreicht werden
$\mu$	Mikro ( $10^{-6}$ )
A	Ampere
ABC	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
ACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit
AMPA-Rezeptor	Ligandengesteuerter, ionotroper Ionenkanal, der direkt durch den erregenden Neurotransmitter Glutamat und auch durch $\gamma$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure (AMPA) geöffnet werden kann
APO	anteriore perioliväre Region
AVCN	anteroventraler Nucleus Cochlearis
beste ITD	stationäres Maximum der ITD-Funktion
BDNF	engl.: brain-derived neurotrophic factor (Neurotrophin, Wachstumsfaktor)
Bulla	Mittelohrhöhle
CaMKII	Calzium-Calmodulin-abhängige-Kinase-II
CC	Stromklemme (engl.: current-clamp)
Cluster	Membranaggregation vieler Neurotransmitter-Rezeptoren
$C_m$	Kapazität der Membran
CN	Nucleus Cochlearis
contra	contralateral
DAB	Di-amino-benzidin
dB	Dezibel
DIC	differentielle Interferenzkontrastoptik
DLPO	dorsolateraler periolivärer Nucleus
DMPO	dorsomedialer periolivärer Nucleus
DNLL	dorsaler Nucleus des lateralen Lemniskus
DP	elektronendichte präsynaptische Spezialisierungen (engl.: dense projections)
DPO	dorsale perioliväre Region

E/I	exzitatorisch (von ipsilateral) / inhibitorisch (von contralateral)
EM	Elektronenmikroskop (-isch)
EPSC	exzitatorischer postsynaptischer Strom (engl.: excitatory postsynaptic current)
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential (engl. excitatory postsynaptic potential)
FM	frequenzmoduliertes Signal
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure, inhibitorischer Neurotransmitter
GABA <sub>A</sub> -Rezeptor	Durch den hemmenden Neurotransmitter GABA direkt ligandengesteuerter, ionotroper Ionenkanal
GABA <sub>B</sub> -Rezeptor	Durch den hemmenden Neurotransmitter GABA, indirekt via zyklischer Nucleotide gesteuerter, metabotroper Kanal
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase, Enzym zur Synthese von $\gamma$ -Aminobuttersäure in Neuronen
GBC	engl.: globular bushy cell (Zelltyp des Nucleus Cochlearis)
Gly	Glycin
GlyR	Glycinrezeptor
G-Proteine	Membranassoziierte Trimere, die Ionenkanäle regulieren können
h	Stunde (engl.: hour)
HMB	halbmaximale Breite; Zeitdifferenz zwischen Anstieg und Abfall des Potentials am 50% Punkt der maximalen Amplitude
HRTF	engl.: head related transfer funktion
Hz	Hertz
I	Strom
I/E	inhibitorisch (von ipsilateral) / exzitatorisch (von contralateral)
IC	Colliculus inferior
IgG	Immunglobulin-G Molekül
I <sub>h</sub>	Durch hyperpolarisations-aktivierte Kationenkanäle vermittelter Strom
IHC	Immunhistochemie
IID	interaurale Intensitätsdifferenz (engl.: interaural intensity difference)
I <sub>KLT</sub>	Durch den niedrigschwellig-aktivierten Kaliumkanal vermittelter Strom
I/V-Kurve	Strom-Spannungsbeziehung eines Neurons

in vitro	Experimente, die nicht im lebenden Organismus sondern an isolierten Zellsystemen durchgeführt werden
in vivo	Experimente, die am lebenden Organismus durchgeführt werden
IPD	Interaurale Phasendifferenz (engl.: interaural phase difference)
IPSC	inhibitorischer postsynaptischer Strom (engl.: inhibitory postsynaptic current)
ipsi	ipsilateral
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential (engl.: inhibitory postsynaptic potential)
IRDIC	differentielle Interferenzkontrastoptik mit Infrarotlicht-Beleuchtung
ITD	interaurale Zeitdifferenz (engl.: interaural time difference)
IWR	einwärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms (engl.: inward rectification)
kDa	Kilodalton
kHz	Kiloherz ( $10^3$ Hertz)
KO-Maus	engl.: knock-out mouse; genetisches Entfernen einer Protein- oder Genfunktion mittels homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen bei Mäusen
LL	lateraler Lemniskus
LM	Lichtmikroskop (-isch)
LNTB	lateraler Nucleus des Trapezkörpers
LSO	laterale obere Olive
LTD	Langzeitunterdrückung (engl.: long term depression)
LTP	Langzeitpotenzierung (engl.: long term potentiation)
LVPO	lateroventraler periolivärer Nucleus
m	Milli ( $10^{-3}$ )
MAP2	engl.: microtubule-associated protein 2
MIP	engl.: maximum intensity projection
mIPSC	spontaner inhibitorischer postsynaptischer Strom (engl.: miniature inhibitory postsynaptic current)
MNTB	medialer Nucleus des Trapezkörpers
MSO	mediale obere Olive
MVPO	medioventraler periolivärer Nucleus
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test (nicht-parametrischer statistischer Test)
nACSF	normale artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit



NCAT/ALPO	Nucleus des zentralen akustischen Trakts
NGS	Ziegen-Normalserum (engl.: normal goat serum)
NMDA	Ligandengesteuerter, ionotroper Ionenkanal, der direkt durch den erregenden Neurotransmitter Glutamat und auch durch N-methyl-D-aspartat geöffnet werden kann
NPC	nicht bipolare MSO-Zelle (engl.: nonprinciple cell)
NRA	Tiere, die in unkorreliertem weißen Rauschen aus allen Raumrichtungen aufgezogen wurden
NT3	Neurotrophin 3 (Wachstumsfaktor)
Offset-Typ	Zelle, die ein Aktionspotential nach Abschalten des Stimulus zeigt
Onset-Typ	Zelle, die ein Aktionspotential am Beginn des Stimulus zeigt
OWR	auswärts gerichtete Gleichrichtung des Stroms (engl.: outward rectification)
P	Tag nach der Geburt
pACSF	artifizielle Cerebrospinalflüssigkeit zur Präparation
PBS	phosphat-gepufferte Saline (engl.: phosphate buffered saline)
PC	bipolare MSO-Zelle (engl.: principle cell)
PCL	Membranfleck-Technik (engl.: patch-clamp technique)
PE	immunhistochemische Färbung vor dem Einbetten des Gewebes in Kunststoff bei EM-Präparaten (engl.: preembedding technique)
Pinna	Ohrmuschel
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PPO	posteriore perioliväre Region
PVCN	posteroventraler Nucleus Cochlearis
R	Widerstand
RGB	Rot-Gelb-Blau-Farbstandard
$R_{in}$	Eingangswiderstand eines Neurons
$R_m$	Membranwiderstand eines Neurons
$R_s$	Serienwiderstand bei Membranfleck-Ableitungen
SAM	sinoidal amplitudenmoduliertes Signal
SBC	engl.: spherical bushy cell (Zelltyp des Nucleus Cochlearis)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: standart error of the mean)
SOC	oberer Olivenkomplex
Soma	Zellkörper

SPL	Schalldruckpegel (engl.: sound pressure level)
SPN	superiorer periolivärer Nucleus
STDP	Modus synaptischer Plastizität, der von der zeitlichen Beziehung des prä- und postsynaptischen Aktionspotentials abhängt (engl.: spike timing-dependent plasticity)
TB	Fasern des Trapezkörpers
TIFF	digitaler Bildstandard
TrkB-Rezeptor	Tyrosinkinase B Rezeptor, bindet die Neurotrophine BDNF, NT3 und NT4/5
TrkC-Rezeptor	Tyrosinkinase C Rezeptor, bindet das Neurotrophin NT3
U	Spannung
UCA	Tiere mit einer einseitigen Cochleaentnahme vor Hörbeginn
V	Volt
VC	Spannungsklemme (engl.: voltage-clamp)
VCN	ventraler Nucleus Cochlearis
VLPO	ventrolateraler periolivärer Nucleus
VMPO	ventromedialer periolivärer Nucleus
VNTB	ventraler Nucleus des Trapezkörpers
$V_{\text{Rest}}$	Ruhemembranpotential eines Neurons

## 8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

<b>Abbildung 1:</b> Afferenzen zur lateralen oberen Olive (LSO).....	13
<b>Abbildung 2:</b> Afferenzen und Efferenzen zur medialen oberen Olive (MSO) .....	18
<b>Abbildung 3:</b> ITD-Sensitivität in der MSO der Wüstenrennmaus.....	22
<b>Abbildung 4:</b> Rolle der Inhibition bei der ITD-Verarbeitung in der MSO .....	25
<b>Abbildung 5:</b> Identifizierung einzelner Glycinrezeptorcluster zur quantitativen Analyse .....	53
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der automatisierten Quantifizierung von Glycin im Gesamtkernbereich der MSO .....	57
<b>Abbildung 7:</b> Schema der Auswahl von Zählfenstern zur Quantifizierung von Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO .....	60
<b>Abbildung 8:</b> Elektrischer Schaltkreis der Ganzzell-PCL-Ableitung .....	73
<b>Abbildung 9:</b> Schema der <i>in vitro</i> Ableitungen am Hirnschnitt .....	74
<b>Abbildung 10:</b> Analysierte Parameter zur Beschreibung der Kinetik von IPSPs und IPSCs.....	76
<b>Abbildung 11:</b> Anatomischer Aufbau des SOC's der Wüstenrennmaus.....	79
<b>Abbildung 12:</b> Anatomie der Wüstenrennmaus MSO in den experimentellen Gruppen.....	81
<b>Abbildung 13:</b> Verteilung von Glycin und Gephyrin auf MSO-Zellen adulter und junger Wüstenrennmäuse .....	83
<b>Abbildung 14:</b> Verteilung von Glycinrezeptoren auf MSO-Neuronen adulter und junger Wüstenrennmäuse .....	84
<b>Abbildung 15:</b> Verteilung von Glycin und Gephyrin auf MSO-Neuronen einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA) .....	87
<b>Abbildung 16:</b> Verteilung von Glycinrezeptoren auf MSO-Neuronen einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse (UCA) .....	88
<b>Abbildung 17:</b> Glycin-DAB markierte MSO-Einzelzellen adulter, junger und einseitig vertäubter Wüstenrennmäuse zur quantitativen Analyse .....	91
<b>Abbildung 18:</b> Quantifizierung der räumlichen Verteilung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen der Wüstenrennmaus .....	96
<b>Abbildung 19:</b> Ultrastruktur der MSO in der adulten Wüstenrennmaus .....	101
<b>Abbildung 20:</b> Präsynaptische Spezialisierungen an inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen zu MSO-Neuronen der adulten Wüstenrennmaus.....	102
<b>Abbildung 21:</b> Ultrastruktur funktioneller inhibitorischer Synapsen an MSO-Neuronen junger Wüstenrennmäuse .....	104
<b>Abbildung 22:</b> Ultrastrukturelle Verteilung inhibitorischer, glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen der adulten und jungen Wüstenrennmaus.....	106

<b>Abbildung 23:</b> Glycinerge Eingänge zu LSO- und SPN-Neuronen in adulten Wüstenrennmäusen .....	109
<b>Abbildung 24:</b> Anatomische Struktur des SOC's der Ratte .....	111
<b>Abbildung 25:</b> Anatomie der Ratten-MSO .....	112
<b>Abbildung 26:</b> Verteilung von Glycin auf MSO-Neuronen der adulten Ratte .....	114
<b>Abbildung 27:</b> Verteilung von Gephyrin auf MSO-Neuronen der adulten und jungen Ratte .....	116
<b>Abbildung 28:</b> Quantifizierung der räumlichen Verteilung glycinерger Eingänge zu MSO-Neuronen der Ratte.....	120
<b>Abbildung 29:</b> Ultrastruktur und Verteilung glycinерger Synapsen an MSO-Neuronen adulter und junger Ratten .....	124
<b>Abbildung 30:</b> Zelltypen in der MSO der Wüstenrennmaus .....	128
<b>Abbildung 31:</b> Ruhemembranpotential der MSO-Neurone .....	130
<b>Abbildung 32:</b> Eingangswiderstand und Membranzeitkonstante der MSO-Neurone.....	132
<b>Abbildung 33:</b> Strom – Spannungsbeziehung (I / V-Kurven) der MSO-Neurone.....	137
<b>Abbildung 34:</b> Spannungstransiente und Nachpotentiale .....	139
<b>Abbildung 35:</b> IPSPs von MSO-Neuronen sind glycinerg .....	141
<b>Abbildung 36:</b> Kinetik der IPSPs von MSO-Neuronen .....	142
<b>Abbildung 37:</b> IPSPs von P14- und P17-MSO-Neuronen .....	145
<b>Abbildung 38:</b> Kinetik der IPSCs von MSO-Neuronen.....	148
<b>Abbildung 39:</b> IPSCs von P14- und P17-MSO-Neuronen.....	151
 <b>Tabelle 1:</b> Einteilung der experimentellen Gruppen .....	 34
<b>Tabelle 2:</b> Anzahl der Tiere an denen Glycin – IHC durchgeführt wurde .....	36
<b>Tabelle 3:</b> Anzahl der Tiere an denen Glycinrezeptor – IHC durchgeführt wurde .....	39
<b>Tabelle 4:</b> Anzahl der Tiere an denen Gephyrin – IHC durchgeführt wurde .....	41
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Objektive und resultierende räumliche Auflösung .....	47
<b>Tabelle 6:</b> Falschfarbencode zur Unterscheidung der immunhistochemischen Färbungen .....	48
<b>Tabelle 7:</b> Einteilung und Herkunft der analysierten Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung Glycin- und Gephyrin-positiver Punkte an einzelnen MSO-Somata und Dendriten .....	50
<b>Tabelle 8:</b> Einteilung und Herkunft der Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung von markierten Glycinrezeptorclustern an den Dendriten einzelner MSO-Zellen .....	51

<b>Tabelle 9:</b> Einteilung und Herkunft der Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung von markierten Gephyrinclustern im Gesamtkernbereich der MSO .....	54
<b>Tabelle 10:</b> Einteilung und Herkunft der Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung von markierten glycinergen Boutons im Gesamtkernbereich der MSO bei adulten Wüstenrennmäusen .....	55
<b>Tabelle 11:</b> Einteilung und Herkunft der Rohdaten zur Bestimmung der Verteilung von markierten Glycinrezeptorclustern im Gesamtkernbereich der MSO .....	59
<b>Tabelle 12:</b> Zusammenfassung der Versuchstiere und der analysierten Zellen bei den <i>in vitro</i> Experimenten .....	63
<b>Tabelle 13:</b> Zusammensetzung der verwendeten artifiziellen Cerebrospinalflüssigkeiten (ACSF) .....	67
<b>Tabelle 14:</b> Zusammensetzung der verwendeten internen Elektrodenlösungen .....	69
<b>Tabelle 15:</b> Zusammenfassung der verwendeten Antagonisten und Blockersubstanzen .....	70
<b>Tabelle 16:</b> Membrankapazität $C_m$ der MSO-Neurone .....	130

## 9 Literaturverzeichnis

- Abbott LF, Nelson SB (2000) Synaptic plasticity: taming the beast. *Nat Neurosci* 3 Suppl: 1178-1183.
- Adams JC (1983) Cytology of periolivary cells and the organization of their projections in the cat. *J Comp Neurol* 215: 275-289.
- Adams JC, Mugnaini E (1984) Dorsal nucleus of the lateral lemniscus: a nucleus of GABAergic projection neurons. *Brain Res Bull* 13: 585-590.
- Adams JC, Mugnaini E (1990) Immunocytochemical evidence for inhibitory and disinhibitory circuits in the superior olive. *Hear Res* 49: 281-298.
- Aghajanian GK, Rasmussen K (1989) Intracellular studies in the facial nucleus illustrating a simple new method for obtaining viable motoneurons in adult rat brain slices. *Synapse* 3: 331-338.
- Agmon-Snir H, Carr CE, Rinzel J (1998) The role of dendrites in auditory coincidence detection. *Nature* 393: 268-272.
- Aizenman CD, Manis PB, Linden DJ (1998) Polarity of long-term synaptic gain change is related to postsynaptic spike firing at a cerebellar inhibitory synapse. *Neuron* 21: 827-835.
- Akagi H, Hirai K, Hishinuma F (1991) Cloning of a glycine receptor subtype expressed in rat brain and spinal cord during a specific period of neuronal development. *FEBS Lett* 281: 160-166.
- Akert K (1972) The ultrastructure of synapses. *Arkh Anat Gistol Embriol* 62: 5-8.
- Allen CB, Celikel T, Feldman DE (2003) Long-term depression induced by sensory deprivation during cortical map plasticity in vivo. *Nat Neurosci* 6: 291-299.
- Altschuler RA, Betz H, Parakkal MH, Reeks KA, Wenthold RJ (1986) Identification of glycinergic synapses in the cochlear nucleus through immunocytochemical localization of the postsynaptic receptor. *Brain Res* 369: 316-320.
- Alvarez FJ, Dewey DE, Harrington DA, Fyffe RE (1997) Cell-type specific organization of glycine receptor clusters in the mammalian spinal cord. *J Comp Neurol* 379: 150-170.
- Antic SD (2003) Action potentials in basal and oblique dendrites of rat neocortical pyramidal neurons. *J Physiol (Lond)* 550: 35-50.
- Ault B, Evans RH, Francis AA, Oakes DJ, Watkins JC (1980) Selective depression of excitatory amino acid induced depolarizations by magnesium ions in isolated spinal cord preparations. *J Physiol (Lond)* 307: 413-428.

- Bal R, Oertel D (2000) Hyperpolarization-activated, mixed-cation current (I<sub>h</sub>) in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 84: 806-817.
- Bal R, Oertel D (2001) Potassium currents in octopus cells of the mammalian cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 86: 2299-2311.
- Balice-Gordon RJ, Chua CK, Nelson CC, Lichtman JW (1993) Gradual loss of synaptic cartels precedes axon withdrawal at developing neuromuscular junctions. *Neuron* 11: 801-815.
- Banks MI, Smith PH (1992) Intracellular recordings from neurobiotin-labeled cells in brain slices of the rat medial nucleus of the trapezoid body. *J Neurosci* 12: 2819-2837.
- Banks MI, Pearce RA, Smith PH (1993) Hyperpolarization-activated cation current (I<sub>h</sub>) in neurons of the medial nucleus of the trapezoid body: Voltage-clamp analysis and enhancement by norepinephrine and cAMP suggest a modulatory mechanism in the auditory brain stem. *J Neurophysiol* 70: 1420-1432.
- Batra R, Kuwada S, Fitzpatrick DC (1997a) Sensitivity to interaural temporal disparities of low- and high- frequency neurons in the superior olivary complex. I. Heterogeneity of responses. *J Neurophysiol* 78: 1222-1236.
- Batra R, Kuwada S, Fitzpatrick DC (1997b) Sensitivity to interaural temporal disparities of low- and high- frequency neurons in the superior olivary complex. II. Coincidence detection. *J Neurophysiol* 78: 1237-1247.
- Bazwinsky I, Hilbig H, Bidmon HJ, Rubsamen R (2003) Characterization of the human superior olivary complex by calcium binding proteins and neurofilament H (SMI-32). *J Comp Neurol* 456: 292-303.
- Becker CM, Hoch W, Betz H (1988) Glycine receptor heterogeneity in rat spinal cord during postnatal development. *EMBO J* 7: 3717-3726.
- Becker CM, Schmieden V, Tarroni P, Strasser U, Betz H (1992) Isoform-selective deficit of glycine receptors in the mouse mutant spastic. *Neuron* 8: 283-289.
- Beckius GE, Batra R, Oliver DL (1999) Axons from anteroventral cochlear nucleus that terminate in medial superior olive of cat: Observations related to delay lines. *J Neurosci* 19: 3146-3161.
- Behrend O, Brand A, Kapfer C, Grothe B (2002) Auditory response properties in the superior paraolivary nucleus of the gerbil. *J Neurophysiol* 87: 2915-2928.
- Bernstein LR (2001) Auditory processing of interaural timing information: New insights. *J Neurosci Res* 66: 1035-1046.
- Bernstein LR, Trahiotis C (1985) Lateralization of low-frequency, complex waveforms: The use of envelope-based temporal disparities. *J Acoust Soc Am* 77: 1868-1880.

- Betz H, Kuhse J, Fischer M, Schmieden V, Laube B, Kuryatov A, Langosch D, Meyer G, Bormann J, Rundstrom N, Matzenbach B, Kirsch J, Ramming M (1994) Structure, diversity and synaptic localization of inhibitory glycine receptors. *J Physiol Paris* 88: 243-248.
- Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: Dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci* 18: 10464-10472.
- Bi GQ, Poo MM (2001) Synaptic modification by correlated activity: Hebb's postulate revisited. *Annu Rev Neurosci* 24: 139-166.
- Blatchley BJ, Cooper WA, Coleman JR (1987) Development of auditory brainstem response to tone pip stimuli in the rat. *Brain Res* 429: 75-84.
- Blauert J (1997) *Spatial Hearing*. Cambridge: MIT Press.
- Bloom FE, Aghajanian GK (1968) Fine structural and cytochemical analysis of the staining of synaptic junctions with phosphotungstic acid. *J Ultrastruct Res* 22: 361-375.
- Bodian D (1966) Electron microscopy: Two major synaptic types on spinal motoneurons. *Science* 151: 1093-1094.
- Bohlhalter S, Mohler H, Fritschy JM (1994) Inhibitory neurotransmission in rat spinal cord: Co-localization of glycine- and GABA<sub>A</sub>-receptors at GABAergic synaptic contacts demonstrated by triple immunofluorescence staining. *Brain Res* 642: 59-69.
- Boudreau JC, Tsuchitani C (1968) Binaural interaction in the cat superior olive S segment. *J Neurophysiol* 31: 442-454.
- Brand A (2003) *Precise temporal processing in the gerbil auditory brainstem*. Dissertation: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Brand A, Behrend O, Marquardt T, McAlpine D, Grothe B (2002) Precise inhibition is essential for microsecond interaural time difference coding. *Nature* 417: 543-547.
- Brenowitz S, Trussell LO (2001) Maturation of synaptic transmission at end-bulb synapses of the cochlear nucleus. *J Neurosci* 21: 9487-9498.
- Brew HM, Forsythe ID (1995) Two voltage-dependent K<sup>+</sup> conductances with complementary functions in postsynaptic integration at a central auditory synapse. *J Neurosci* 15: 8011-8022.
- Brown AM (1987) Acoustic distortion from rodent ears: A comparison of responses from rats, guinea pigs and gerbils. *Hear Res* 31: 25-37.



- Brown MC, Berglund AM, Kiang NY, Ryugo DK (1988) Central trajectories of type II spiral ganglion neurons. *J Comp Neurol* 278: 581-590.
- Brughera AR, Stutman ER, Carney LH, Colburn HS (1996) A model with excitation and inhibition for cells in the medial superior olive. *Audit Neurosci* 2: 219-233.
- Brunso-Bechtold JK, Henkel CK, Linville C (1990) Synaptic organization in the adult ferret medial superior olive. *J Comp Neurol* 294: 389-398.
- Brunso-Bechtold JK, Henkel CK, Linville C (1992) Ultrastructural development of the medial superior olive (MSO) in the ferret. *J Comp Neurol* 324: 539-556.
- Budinger E, Heil P, Scheich H (2000) Functional organization of auditory cortex in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). IV. Connections with anatomically characterized subcortical structures. *Eur J Neurosci* 12: 2452-2474.
- Buhl EH, Halasy K, Somogyi P (1994) Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368: 823-828.
- Buhl EH, Cobb SR, Halasy K, Somogyi P (1995) Properties of unitary IPSPs evoked by anatomically identified basket cells in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 7: 1989-2004.
- Burgoyne RD, Cumming R (1984) Ontogeny of microtubule-associated protein 2 in rat cerebellum: Differential expression of the doublet polypeptides. *Neuroscience* 11: 156-167.
- Busetto G, Buffelli M, Tognana E, Bellico F, Cangiano A (2000) Hebbian mechanisms revealed by electrical stimulation at developing rat neuromuscular junctions. *J Neurosci* 20: 685-695.
- Butler RA (1969) On the relative usefulness of monaural and binaural cues in locating sound in space. *Psychon Sci* 17: 245-246.
- Cabot JB, Bushnell A, Alessi V, Mendell NR (1995) Postsynaptic gephyrin immunoreactivity exhibits a nearly one-to-one correspondence with gamma-aminobutyric acid-like immunogold-labeled synaptic inputs to sympathetic preganglionic neurons. *J Comp Neurol* 356: 418-432.
- Caceres A, Banker GA, Binder L (1986) Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. *J Neurosci* 6: 714-722.
- Caicedo A, Eybalin M (1999) Glutamate receptor phenotypes in the auditory brainstem and mid-brain of the developing rat. *Eur J Neurosci* 11: 51-74.

- Caicedo A, Kungel M, Pujol R, Friauf E (1998) Glutamate-induced  $\text{Co}^{2+}$  uptake in rat auditory brainstem neurons reveals developmental changes in  $\text{Ca}^{2+}$  permeability of glutamate receptors. *Eur J Neurosci* 10: 941-954.
- Caird D, Klinke R (1983) Processing of binaural stimuli by cat superior olivary complex neurons. *Exp Brain Res* 52: 385-399.
- Calford MB, Moore DR, Hutchings ME (1986) Central and peripheral contributions to coding of acoustic space by neurons in inferior colliculus of cat. *J Neurophysiol* 55: 587-603.
- Campos ML, de Cabo C, Wisden W, Juiz JM, Merlo D (2001) Expression of GABA(A) receptor subunits in rat brainstem auditory pathways: Cochlear nuclei, superior olivary complex and nucleus of the lateral lemniscus. *Neuroscience* 102: 625-638.
- Cant NB (1984) The fine structure of the lateral superior olivary nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 227: 63-77.
- Cant NB (1991) Projections to the lateral and medial superior olivary nuclei from the spherical and globular bushy cells of the anteroventral cochlear nucleus. In: *The neurobiology of hearing: The central auditory system* (Altschuler RA, Bobbin RP, Clopton BM, Hoffman DW, eds), pp 99-119. New York: Raven Press.
- Cant NB, Casseday JH (1986) Projections from the anteroventral cochlear nucleus to the lateral and medial superior olivary nuclei. *J Comp Neurol* 247: 457-476.
- Cant NB, Hyson RL (1992) Projections from the lateral nucleus of the trapezoid body to the medial superior olivary nucleus in the gerbil. *Hear Res* 58: 26-34.
- Carney LH (1993) A model for the responses of low-frequency auditory-nerve fibers in cat. *J Acoust Soc Am* 93: 401-417.
- Carr CE, Konishi M (1988) Axonal delay lines for time measurement in the owl's brainstem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8311-8315.
- Carr CE, Konishi M (1990) A circuit for detection of interaural time differences in the brain stem of the barn owl. *J Neurosci* 10: 3227-3246.
- Casey MA, Feldman ML (1985) Aging in the rat medial nucleus of the trapezoid body. II. Electron microscopy. *J Comp Neurol* 232: 401-413.
- Casseday JH, Neff WD (1973) Localization of pure tones. *J Acoust Soc Am* 54: 365-372.
- Casseday JH, Covey E, Vater M (1988) Connections of the superior olivary complex in the rufous horseshoe bat *Rhinolophus rouxi*. *J Comp Neurol* 278: 313-329.
- Cathala L, Brickley S, Cull-Candy S, Farrant M (2003) Maturation of EPSCs and intrinsic membrane properties enhances precision at a cerebellar synapse. *J Neurosci* 23: 6074-6085.

- Chang EH, Kotak VC, Sanes DH (2003) Long-term depression of synaptic inhibition is expressed postsynaptically in the developing auditory system. *J Neurophysiol* 90: 1479-1488.
- Chapman B, Jacobson MD, Reiter HO, Stryker MP (1986) Ocular dominance shift in kitten visual cortex caused by imbalance in retinal electrical activity. *Nature* 324: 154-156.
- Chuhma N, Ohmori H (1998) Postnatal development of phase-locked high-fidelity synaptic transmission in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Neurosci* 18: 512-520.
- Clark GM (1969a) The ultrastructure of nerve endings in the medial superior olive of the cat. *Brain Res* 14: 293-305.
- Clark GM (1969b) Vesicle shape versus type of synapse in the nerve endings of the cat medial superior olive. *Brain Res* 15: 548-551.
- Clark GM, Dunlop CW (1968) Field potentials in the cat medial superior olivary nucleus. *Exp Neurol* 20: 31-42.
- Craig AM, Blackstone CD, Huganir RL, Banker G (1993) The distribution of glutamate receptors in cultured rat hippocampal neurons: Postsynaptic clustering of AMPA-selective subunits. *Neuron* 10: 1055-1068.
- Craig AM, Blackstone CD, Huganir RL, Banker G (1994) Selective clustering of glutamate and gamma-aminobutyric acid receptors opposite terminals releasing the corresponding neurotransmitters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12373-12377.
- Craig AM, Banker G, Chang W, McGrath ME, Serpinskaya AS (1996) Clustering of gephyrin at GABAergic but not glutamatergic synapses in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurosci* 16: 3166-3177.
- Crepel F, Mariani J, Delhay-Bouchaud N (1976) Evidence for a multiple innervation of Purkinje cells by climbing fibers in the immature rat cerebellum. *J Neurobiol* 7: 567-578.
- Crow G, Rupert AL, Moushegian G (1978) Phase locking in monaural and binaural medullary neurons: Implications for binaural phenomena. *J Acoust Soc Am* 64: 493-501.
- Cuttle MF, Rusznak Z, Wong AYC, Owens S, Forsythe ID (2001) Modulation of a presynaptic hyperpolarization-activated cationic current (I<sub>h</sub>) at an excitatory synaptic terminal in the rat auditory brainstem. *J Physiol (Lond)* 534: 733-744.
- Dallos P, Harris D, Ozdamar O, Ryan A (1978) Behavioral, compound action potential, and single unit thresholds: Relationship in normal and abnormal ears. *J Acoust Soc Am* 64: 151-157.

- David EE, Guttman N, Vanbergeijk WA (1959) Binaural interaction of high-frequency complex stimuli. *J Acoust Soc Am* 31: 774-782.
- Diamond JS, Jahr CE (1995) Asynchronous release of synaptic vesicles determines the time course of the AMPA receptor-mediated EPSC. *Neuron* 15: 1097-1107.
- Dumoulin A, Triller A, Dieudonne S (2001) IPSC kinetics at identified GABAergic and mixed GABAergic and glycinergic synapses onto cerebellar Golgi cells. *J Neurosci* 21: 6045-6057.
- Egger V, Feldmeyer D, Sakmann B (1999) Coincidence detection and changes of synaptic efficacy in spiny stellate neurons in rat barrel cortex. *Nat Neurosci* 2: 1098-1105.
- Ehrhardt V (2000) Restriktion glycinergischer Synapsen an der MSO von Wüstenrennmäusen im Alter von 12 bis 19 Tagen. Diplomarbeit: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Ehrlich I, Lohrke S, Friauf E (1999) Shift from depolarizing to hyperpolarizing glycine action in rat auditory neurones is due to age-dependent Cl<sup>-</sup> regulation. *J Physiol (Lond)* 520: 121-137.
- Elezgarai I, Benitez R, Mateos JM, Lazaro E, Osorio A, Azkue JJ, Bilbao A, Lingenhoehl K, Van Der PH, Hampson DR, Kuhn R, Knopfel T, Grandes P (1999) Developmental expression of the group III metabotropic glutamate receptor mGluR4a in the medial nucleus of the trapezoid body of the rat. *J Comp Neurol* 411: 431-440.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM, Luscher B (1998) Postsynaptic clustering of major GABA(A) receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1: 563-571.
- Feldman DE (2000) Timing-based LTP and LTD at vertical inputs to layer II/III pyramidal cells in rat barrel cortex. *Neuron* 27: 45-56.
- Feng G, Tintrop H, Kirsch J, Nichol MC, Kuhse J, Betz, Sanes JR (1998) Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity. *Science* 282: 1321-1324.
- Finck A, Schneck CD, Hartman AF (1972) Development of cochlear function in the neonate Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J Comp Physiol Psychol* 78: 375-380.
- Franklin KB, Paxinos G (1997) The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press.
- Freund TF (2003) Interneuron diversity series: Rhythm and mood in perisomatic inhibition. *Trends Neurosci* 26: 489-495.

- Freund TF, Buzsaki G (1996) Interneurons of the hippocampus. *Hippocampus* 6: 347-470.
- Friauf E (1992) Tonotopic order in the adult and developing auditory system of the rat as shown by c-fos immunocytochemistry. *Eur J Neurosci* 4: 798-812.
- Friauf E, Ostwald J (1988) Divergent projections of physiologically characterized rat ventral cochlear nucleus neurons as shown by intra-axonal injection of horseradish peroxidase. *Exp Brain Res* 73: 263-284.
- Friauf E, Hammerschmidt B, Kirsch J (1997) Development of adult-type inhibitory glycine receptors in the central auditory system of rats. *J Comp Neurol* 385: 117-134.
- Fricker D, Miles R (2000) EPSP amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons. *Neuron* 28: 559-569.
- Fu XW, Brezden BL, Wu SH (1997) Hyperpolarization-activated inward current in neurons of the rat's dorsal nucleus of the lateral lemniscus in vitro. *J Neurophysiol* 78: 2235-2245.
- Fuse G (1919) Innerer Aufbau der zentralen akustischen Bahnen. *Arb Anat Inst Kaiserl-Japan Univ Sendai* 2: 275-384
- Futai K, Okada M, Matsuyama K, Takahashi T (2001) High-fidelity transmission acquired via a developmental decrease in NMDA receptor expression at an auditory synapse. *J Neurosci* 21: 3342-3349.
- Gaiarsa JL, Caillard O, Ben Ari Y (2002) Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: Mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci* 25: 564-570.
- Galambos R, Davis H (1943) The response of single auditory-nerve fibres to acoustic stimulation. *J Neurophysiol* 6: 39-57.
- Galambos R, Schwartzkopff J, Rupert A (1959) Microelectrode study of superior olivary nuclei. *Am J Physiol* 197: 527-536.
- Galarreta M, Hestrin S (2001) Spike transmission and synchrony detection in networks of GABAergic interneurons. *Science* 292: 2295-2299.
- Gan WB, Lichtman JW (1998) Synaptic segregation at the developing neuromuscular junction. *Science* 282: 1508-1511.
- Gardner MB, Gardner RS (1973) Problem of localization in the median plane: Effect of pinnae cavity occlusion. *J Acoust Soc Am* 53: 400-408.
- Geiman EJ, Knox MC, Alvarez FJ (2000) Postnatal maturation of gephyrin/glycine receptor clusters on developing Renshaw cells. *J Comp Neurol* 426: 130-142.

- Geiman EJ, Zheng W, Fritschy JM, Alvarez FJ (2002) Glycine and GABA(A) receptor subunits on Renshaw cells: Relationship with presynaptic neurotransmitters and postsynaptic gephyrin clusters. *J Comp Neurol* 444: 275-289.
- Gentet LJ, Clements JD (2002) Binding site stoichiometry and the effects of phosphorylation on human  $\alpha 1$  homomeric glycine receptors. *J Physiol (Lond)* 544: 97-106.
- Gerstner W, Kempter R, van Hemmen JL, Wagner H (1996) A neuronal learning rule for sub-millisecond temporal coding. *Nature* 383: 76-81.
- Giustetto M, Kirsch J, Fritschy JM, Cantino D, Sassoe-Pognetto M (1998) Localization of the clustering protein gephyrin at GABAergic synapses in the main olfactory bulb of the rat. *J Comp Neurol* 395: 231-244.
- Gleich O, Vater M (1998) Postnatal development of GABA- and glycine-like immunoreactivity in the cochlear nucleus of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Cell Tissue Res* 293: 207-225.
- Glendenning KK, Baker BN (1988) Neuroanatomical distribution of receptors for three potential inhibitory neurotransmitters in the brainstem auditory nuclei of the cat. *J Comp Neurol* 275: 288-308.
- Glendenning KK, Brunso-Bechtold JK, Thompson GC, Masterton RB (1981) Ascending auditory afferents to the nuclei of the lateral lemniscus. *J Comp Neurol* 197: 673-703.
- Glendenning KK, Hutson KA, Nudo RJ, Masterton RB (1985) Acoustic chiasm II: Anatomical basis of binaurality in lateral superior olive of cat. *J Comp Neurol* 232: 261-285.
- Godfrey DA, Kiang NY, Norris BE (1975) Single unit activity in the posteroventral cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 162: 247-268.
- Goldberg JM, Brown PB (1968) Functional organization of the dog superior olivary complex: An anatomical and electrophysiological study. *J Neurophysiol* 31: 639-656.
- Goldberg JM, Brown PB (1969) Response of binaural neurons of dog superior olivary complex to dichotic tonal stimuli: Some physiological mechanisms of sound localization. *J Neurophysiol* 32: 613-636.
- Golding NL, Robertson D, Oertel D (1995) Recordings from slices indicate that octopus cells of the cochlear nucleus detect coincident firing of auditory nerve fibers with temporal precision. *J Neurosci* 15: 3138-3153.

- Golding NL, Ferragamo MJ, Oertel D (1999) Role of intrinsic conductances underlying responses to transients in octopus cells of the cochlear nucleus. *J Neurosci* 19: 2897-2905.
- Gonzalez-Hernandez T, Mantolan-Sarmiento B, Gonzalez-Gonzalez B, Perez-Gonzalez H (1996) Sources of GABAergic input to the inferior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 372: 309-326.
- Graham D, Pfeiffer F, Simler R, Betz H (1985) Purification and characterization of the glycine receptor of pig spinal cord. *Biochemistry* 24: 990-994.
- Gray EG (1959) Axo-somatic and axo-dendritic synapses of the cerebral cortex: An electron microscope study. *J Anat* 93: 420-433.
- Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45: 1227-1234.
- Grothe B (1994) Interaction of excitation and inhibition in processing of pure tone and amplitude-modulated stimuli in the medial superior olive of the mustached bat. *J Neurophysiol* 71: 706-721.
- Grothe B (1997) Inhibition is essential for temporal processing in the auditory pathway. In: *Proc German Zoologic Soc* 88 (Zissler D, ed), p 284. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag.
- Grothe B (2000) The evolution of temporal processing in the medial superior olive, an auditory brainstem structure. *Prog Neurobiol* 61: 581-610.
- Grothe B (2003) New roles for synaptic inhibition in sound localization. *Nat Rev Neurosci* 4: 540-550.
- Grothe B, Park TJ (1998) Sensitivity to interaural time differences in the medial superior olive of a small mammal, the Mexican free-tailed bat. *J Neurosci* 18: 6608-6622.
- Grothe B, Sanes DH (1993) Bilateral inhibition by glycinergic afferents in the medial superior olive. *J Neurophysiol* 69: 1192-1196.
- Grothe B, Sanes DH (1994) Synaptic inhibition influences the temporal coding properties of medial superior olivary neurons: An in vitro study. *J Neurosci* 14: 1701-1709.
- Grothe B, Schweizer H, Pollak GD, Schuller G, Rosemann C (1994) Anatomy and projection patterns of the superior olivary complex in the Mexican free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis mexicana*. *J Comp Neurol* 343: 630-646.
- Grothe B, Park TJ, Schuller G (1997) Medial superior olive in the free-tailed bat: Response to pure tones and amplitude-modulated tones. *J Neurophysiol* 77: 1553-1565.

- Grothe B, Covey E, Casseday JH (2001) Medial superior olive of the big brown bat: Neuronal responses to pure tones, amplitude modulations, and pulse trains. *J Neurophysiol* 86: 2219-2230.
- Grudt TJ, Henderson G (1998) Glycine and GABA<sub>A</sub> receptor-mediated synaptic transmission in rat substantia gelatinosa: Inhibition by  $\mu$ -opioid and GABA<sub>B</sub> agonists. *J Physiol (Lond)* 507: 473-483.
- Grunert U, Wassle H (1993) Immunocytochemical localization of glycine receptors in the mammalian retina. *J Comp Neurol* 335: 523-537.
- Guinan JJ, Jr., Li RY (1990) Signal processing in brainstem auditory neurons which receive giant endings (calyces of Held) in the medial nucleus of the trapezoid body of the cat. *Hear Res* 49: 321-334.
- Guinan JJ, Jr., Guinan SS, Norris BE (1972a) Single auditory units in the superior olivary complex I: Responses to sounds and classifications based on physiological properties. *Intern J Neurosci* 4: 101-120.
- Guinan JJ, Jr., Norris BE, Guinan SS (1972b) Single auditory units in the superior olivary complex II: Locations of unit categories and tonotopic organization. *Intern J Neurosci* 4: 147-166.
- Gulledge AT, Stuart GJ (2003) Excitatory actions of GABA in the cortex. *Neuron* 37: 299-309.
- Hackney CM, Osen KK, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Manjaly G (1996) Immunocytochemical evidence that glutamate is a neurotransmitter in the cochlear nerve: A quantitative study in the guinea-pig anteroventral cochlear nucleus. *Eur J Neurosci* 8: 79-91.
- Hafidi A (1999) Distribution of BDNF, NT-3 and NT-4 in the developing auditory brainstem. *Int J Dev Neurosci* 17: 285-294.
- Hafidi A, Moore T, Sanes DH (1996) Regional distribution of neurotrophin receptors in the developing auditory brainstem. *J Comp Neurol* 367: 454-464.
- Hafer ER, Jeffress LA (1968) Two-image lateralization of tones and clicks. *J Acoust Soc Am* 44: 563-569.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391: 85-100.
- Hamill OP, Bormann J, Sakmann B (1983) Activation of multiple-conductance state chloride channels in spinal neurones by glycine and GABA. *Nature* 305: 805-808.



- Harnischfeger G, Neuweiler G, Schlegel P (1985) Interaural time and intensity coding in superior olivary complex and inferior colliculus of the echolocating bat *Molossus ater*. *J Neurophysiol* 53: 89-109.
- Harrison JM, Feldman ML (1970) Anatomical aspects of the cochlear nucleus and superior olivary complex. *Contrib Sens Physiol* 4: 95-142.
- Harrison JM, Irving R (1966a) Ascending connections of the anterior ventral cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 126: 51-63.
- Harrison JM, Irving R (1966b) Visual and nonvisual auditory systems in mammals. Anatomical evidence indicates two kinds of auditory pathways and suggests two kinds of hearing in mammals. *Science* 154: 738-743.
- Harrison JM, Warr WB (1962) A study of the cochlear nuclei and ascending auditory pathways of the medulla. *J Comp Neurol* 119: 341-380.
- Harvey RJ, Schmieden V, Von Holst A, Laube B, Rohrer H, Betz H (2000) Glycine receptors containing the  $\alpha 4$  subunit in the embryonic sympathetic nervous system, spinal cord and male genital ridge. *Eur J Neurosci* 12: 994-1001.
- Hausser M (2001) Synaptic function: Dendritic democracy. *Curr Biol* 11: R10-R12.
- Hausser M, Mel B (2003) Dendrites: Bug or feature? *Curr Opin Neurobiol* 13: 372-383.
- Hausser M, Spruston N, Stuart GJ (2000) Diversity and dynamics of dendritic signaling. *Science* 290: 739-744.
- Hebrank J, Wright D (1974a) Are two ears necessary for localization of sound sources on the median plane? *J Acoust Soc Am* 56: 935-938.
- Hebrank J, Wright D (1974b) Spectral cues used in the localization of sound sources on the median plane. *J Acoust Soc Am* 56: 1829-1834.
- Heffner RS, Heffner HE (1980) Hearing in the elephant (*Elephas maximus*). *Science* 208: 518-520.
- Heffner RS, Heffner HE (1985) Hearing range of the domestic cat. *Hear Res* 19: 85-88.
- Heffner RS, Heffner HE (1987) Localization of noise, use of binaural cues, and a description of the superior olivary complex in the smallest carnivore, the least weasel (*Mustela nivalis*). *Behav Neurosci* 101: 701-705.
- Heffner RS, Heffner HE (1988) Sound localization and use of binaural cues by the gerbil (*Meriones unguiculatus*). *Behav Neurosci* 102: 422-428.
- Heffner RS, Heffner HE (1991) Behavioral hearing range of the chinchilla. *Hear Res* 52: 13-16.

- Heffner RS, Heffner HE (1992) Evolution of Sound Localization in Mammals. In: The Evolutionary Biology of Hearing (Webster DB, Fay RR, Popper AN, eds), pp 691-716. New York: Springer-Verlag.
- Heffner RS, Heffner HE, Kearns D, Vogel J, Koay G (1994) Sound localization in chinchillas. I: Left/right discriminations. *Hear Res* 80: 247-257.
- Heffner RS, Koay G, Heffner HE (2001) Audiograms of five species of rodents: Implications for the evolution of hearing and the perception of pitch. *Hear Res* 157: 138-152.
- Held H (1893) Die zentrale Gehörleitung. *Arch Anat Physiol* 17: 201-248.
- Helfert RH, Aschoff A (1997) Superior olivary complex and nuclei of the lateral lemniscus. In: The central auditory system (Ehret G, Romand R, eds), pp 193-258. New York: Oxford University Press.
- Helfert RH, Bonneau JM, Wenthold RJ, Altschuler RA (1989) GABA and glycine immunoreactivity in the guinea pig superior olivary complex [published erratum appears in *Brain Res* 1990 Feb 12;509(1):180]. *Brain Res* 501: 269-286.
- Helfert RH, Snead CR, Altschuler RA (1991) The ascending auditory pathways. In: The neurobiology of hearing: The central auditory system (Altschuler RA, Bobbin RP, Clopton BM, Hoffman DW, eds), pp 1-25. New York: Raven Press.
- Helfert RH, Juiz JM, Bledsoe SC, Bonneau JM, Wenthold RJ, Altschuler RA (1992) Patterns of glutamate, glycine, and GABA immunolabeling in four synaptic terminal classes in the lateral superior olive of the guinea pig. *J Comp Neurol* 323: 305-325.
- Henkel CK (1997) Axonal morphology in fibrodendritic laminae of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus: Afferent projections from the medial superior olivary nucleus. *J Comp Neurol* 380: 136-144.
- Henning GB (1974a) Detectability of interaural delay in high-frequency complex waveforms. *J Acoust Soc Am* 55: 84-90.
- Henning GB (1974b) Lateralization and the binaural masking-level difference. *J Acoust Soc Am* 55: 1259-1262.
- Hofmann P (1908) Die obere Olive der Säugetiere nebst Bemerkungen über die Lage der Cochlearisendkerne. *Arb Neurol Inst Wien Univ (Obersteiner)* 14: 76-328.
- Holmgren CD, Zilberter Y (2001) Coincident spiking activity induces long-term changes in inhibition of neocortical pyramidal cells. *J Neurosci* 21: 8270-8277.
- Hooper SL, Buchman E, Hobbs KH (2002) A computational role for slow conductances: Single-neuron models that measure duration. *Nat Neurosci* 5: 552-556.

- Hopkins WF, Allen ML, Houamed KM, Tempel BL (1994) Properties of voltage-gated K<sup>+</sup> currents expressed in *Xenopus* oocytes by mKv1.1, mKv1.2 and their heteromultimers as revealed by mutagenesis of the dendrotoxin-binding site in mKv1.1. *Pflugers Arch* 428: 382-390.
- Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ, Smart TG (2003) Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: Discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat Neurosci* 6: 362-369.
- Huang GT, Rosowski JJ, Ravicz ME, Peake WT (2002) Mammalian ear specializations in arid habitats: Structural and functional evidence from sand cat (*Felis margarita*). *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 188: 663-681.
- Hubel DH, Wiesel TN, LeVay S (1977) Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 278: 377-409.
- Ichise T, Kano M, Hashimoto K, Yanagihara D, Nakao K, Shigemoto R, Katsuki M, Aiba A (2000) mGluR1 in cerebellar Purkinje cells essential for long-term depression, synapse elimination, and motor coordination. *Science* 288: 1832-1835.
- Inbody SB, Feng AS (1981) Binaural response characteristics of single neurons in the medial superior olivary nucleus of the albino rat. *Brain Res* 210: 361-366.
- Irvine DR (1986) The auditory brainstem. In: *Progress in sensory physiology* 7 (Autrum H, Ottoson D, Perl ER, Schmidt RF, Shimazu H, Willis WD, eds), pp 1-121. New York: Springer-Verlag.
- Irvine DR (1992) Physiology of the auditory brainstem. In: *The mammalian auditory pathway: Neurophysiology* (Popper AN, Fay RR, eds), pp 153-231. New York: Springer-Verlag.
- Irvine DR, Park VN, Mattingley JB (1995) Responses of neurons in the inferior colliculus of the rat to interaural time and intensity differences in transient stimuli: Implications for the latency hypotheses. *Hear Res* 85: 127-141.
- Irvine DR, Park VN, McCormick L (2001) Mechanisms underlying the sensitivity of neurons in the lateral superior olive to interaural intensity differences. *J Neurophysiol* 86: 2647-2666.
- Irving R, Harrison JM (1967) The superior olivary complex and audition: A comparative study. *J Comp Neurol* 130: 77-86.
- Isaacson JS, Walmsley B (1995) Counting quanta: Direct measurements of transmitter release at a central synapse. *Neuron* 15: 875-884.
- Iwasaki S, Takahashi T (1998) Developmental changes in calcium channel types mediating synaptic transmission in rat auditory brainstem. *J Physiol (Lond)* 509: 419-423.

- Izant JG, McIntosh JR (1980) Microtubule-associated proteins: A monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 4741-4745.
- Jack JJ, Redman SJ (1971) The propagation of transient potentials in some linear cable structures. *J Physiol (Lond)* 215: 283-320.
- Jaramillo F, Vicini S, Schuetze SM (1988) Embryonic acetylcholine receptors guarantee spontaneous contractions in rat developing muscle. *Nature* 335: 66-68.
- Jeffress LA (1948) A place theory of sound localization. *J Comp Physiol Psychol* 41: 35-39.
- Jinno S, Ishizuka S, Kosaka T (2003) Ionic currents underlying rhythmic bursting of ventral mossy cells in the developing mouse dentate gyrus. *Eur J Neurosci* 17: 1338-1354.
- Joris PX (1996) Envelope coding in the lateral superior olive. II. Characteristic delays and comparison with responses in the medial superior olive. *J Neurophysiol* 76: 2137-2156.
- Joris PX, Yin TC (1995) Envelope coding in the lateral superior olive. I. Sensitivity to interaural time differences. *J Neurophysiol* 73: 1043-1062.
- Joris PX, Carney LH, Smith PH, Yin TC (1994a) Enhancement of neural synchronization in the anteroventral cochlear nucleus. I. Responses to tones at the characteristic frequency. *J Neurophysiol* 71: 1022-1036.
- Joris PX, Smith PH, Yin TC (1994b) Enhancement of neural synchronization in the anteroventral cochlear nucleus. II. Responses in the tuning curve tail. *J Neurophysiol* 71: 1037-1051.
- Joris PX, Smith PH, Yin TC (1998) Coincidence detection in the auditory system: 50 years after Jeffress. *Neuron* 21: 1235-1238.
- Joseph AW, Hyson RL (1993) Coincidence detection by binaural neurons in the chick brain stem. *J Neurophysiol* 69: 1197-1211.
- Kakizawa S, Yamasaki M, Watanabe M, Kano M (2000) Critical period for activity-dependent synapse elimination in developing cerebellum. *J Neurosci* 20: 4954-4961.
- Kalla R, Liu Z, Xu S, Koppius A, Imai Y, Kloss CU, Kohsaka S, Gschwendtner A, Moller JC, Werner A, Raivich G (2001) Microglia and the early phase of immune surveillance in the axotomized facial motor nucleus: Impaired microglial activation and lymphocyte recruitment but no effect on neuronal survival or axonal regeneration in macrophage-colony stimulating factor-deficient mice. *J Comp Neurol* 436: 182-201.

- Kandler K, Friauf E (1993) Pre- and postnatal development of efferent connections of the cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol* 328: 161-184.
- Kandler K, Friauf E (1995a) Development of electrical membrane properties and discharge characteristics of superior olivary complex neurons in fetal and postnatal rats. *Eur J Neurosci* 7: 1773-1790.
- Kandler K, Friauf E (1995b) Development of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in the auditory brainstem of perinatal rats. *J Neurosci* 15: 6890-6904.
- Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M (1998) Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci* 1: 683-692.
- Kapfer C (1999) Aktivitätsabhängige Restriktion inhibitorischer Eingänge zu auditorischen Neuronen. Diplomarbeit: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Kapfer C, Seidl AH, Schweizer H, Grothe B (2002) Experience-dependent refinement of inhibitory inputs to auditory coincidence-detector neurons. *Nat Neurosci* 5: 247-253.
- Kasper EM, Larkman AU, Lubke J, Blakemore C (1994) Pyramidal neurons in layer 5 of the rat visual cortex. II. Development of electrophysiological properties. *J Comp Neurol* 339: 475-494.
- Katz LC, Shatz CJ (1996) Synaptic activity and the construction of cortical circuits. *Science* 274: 1133-1138.
- Kawaguchi Y, Kubota Y (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb Cortex* 7: 476-486.
- Keller-Peck CR, Walsh MK, Gan WB, Feng G, Sanes JR, Lichtman JW (2001) Asynchronous synapse elimination in neonatal motor units: Studies using GFP transgenic mice. *Neuron* 31: 381-394.
- Kelly JB, Masterton B (1977) Auditory sensitivity of the albino rat. *J Comp Physiol Psychol* 91: 930-936.
- Kim G, Kandler K (2003) Elimination and strengthening of glycinergic/GABAergic connections during tonotopic map formation. *Nat Neurosci* 6: 282-290.
- Kirsch J, Betz H (1998) Glycine-receptor activation is required for receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 392: 717-720.
- Kirsch J, Langosch D, Prior P, Littauer UZ, Schmitt B, Betz H (1991) The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin. *J Biol Chem* 266: 22242-22245.
- Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H (1993) Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366: 745-748.

- Kiss A, Majorossy K (1983) Neuron morphology and synaptic architecture in the medial superior olivary nucleus. Light- and electron microscope studies in the cat. *Exp Brain Res* 52: 315-327.
- Kitzes LM, Kageyama GH, Semple MN, Kil J (1995) Development of ectopic projections from the ventral cochlear nucleus to the superior olivary complex induced by neonatal ablation of the contralateral cochlea. *J Comp Neurol* 353: 341-363.
- Klumpp RG (1953) Discriminability of interaural time difference. *J Acoust Soc Am* 25: 823.
- Klumpp RG, Eady H (1956) Some measurements of interaural time difference thresholds. *J Acoust Soc Am* 28: 215-232.
- Kneussel M (2002) Dynamic regulation of GABA(A) receptors at synaptic sites. *Brain Res Brain Res Rev* 39: 74-83.
- Kneussel M, Betz H (2000) Receptors, gephyrin and gephyrin-associated proteins: Novel insights into the assembly of inhibitory postsynaptic membrane specializations. *J Physiol (Lond)* 525: 1-9.
- Kneussel M, Brandstatter JH, Laube B, Stahl S, Muller U, Betz H (1999a) Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice. *J Neurosci* 19: 9289-9297.
- Kneussel M, Hermann A, Kirsch J, Betz H (1999b) Hydrophobic interactions mediate binding of the glycine receptor beta-subunit to gephyrin. *J Neurochem* 72: 1323-1326.
- Koay G, Heffner HE, Heffner RS (1997) Audiogram of the big brown bat (*Eptesicus fuscus*). *Hear Res* 105: 202-210.
- Koay G, Heffner RS, Heffner HE (1998) Hearing in a megachiropteran fruit bat (*Rousettus aegyptiacus*). *J Comp Psychol* 112: 371-382.
- Koch U, Grothe B (2003) Hyperpolarization-activated current (I<sub>h</sub>) in the inferior colliculus: Distribution and contribution to temporal processing. *J Neurophysiol*, in press
- Koch U, Sanes DH (1998) Afferent regulation of glycine receptor distribution in the gerbil LSO. *Microsc Res Tech* 41: 263-269.
- Kollmar I (2003) Plastizität im auditorischen Hirnstamm der mongolischen Wüstenrennmaus induziert durch akustisches Rauschen. Diplomarbeit: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Komatsu Y (1994) Age-dependent long-term potentiation of inhibitory synaptic transmission in rat visual cortex. *J Neurosci* 14: 6488-6499.

- Komatsu Y (1996) GABA<sub>B</sub> receptors, monoamine receptors, and postsynaptic inositol trisphosphate-induced Ca<sup>2+</sup> release are involved in the induction of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J Neurosci* 16: 6342-6352.
- Komatsu Y, Iwakiri M (1993) Long-term modification of inhibitory synaptic transmission in developing visual cortex. *Neuroreport* 4: 907-910.
- Komatsu Y, Yoshimura Y (2000) Activity-dependent maintenance of long-term potentiation at visual cortical inhibitory synapses. *J Neurosci* 20: 7539-7546.
- Konishi M (1973) How The Owl Tracks Its Prey. *Am Sci* 61: 414-424.
- Korada S, Schwartz IR (1999) Development of GABA, glycine, and their receptors in the auditory brainstem of gerbil: A light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 409: 664-681.
- Korn H, Oda Y, Faber DS (1992) Long-term potentiation of inhibitory circuits and synapses in the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 440-443.
- Kotak VC, Sanes DH (1996) Developmental influence of glycinergic transmission: regulation of NMDA receptor-mediated EPSPs. *J Neurosci* 16: 1836-1843.
- Kotak VC, Sanes DH (2000) Long-lasting inhibitory synaptic depression is age- and calcium- dependent. *J Neurosci* 20: 5820-5826.
- Kotak VC, Sanes DH (2002) Postsynaptic kinase signaling underlies inhibitory synaptic plasticity in the lateral superior olive. *J Neurobiol* 53: 36-43.
- Kotak VC, Korada S, Schwartz IR, Sanes DH (1998) A developmental shift from GABAergic to glycinergic transmission in the central auditory system. *J Neurosci* 18: 4646-4655.
- Kotak VC, DiMattina C, Sanes DH (2001) GABA(B) and Trk receptor signaling mediates long-lasting inhibitory synaptic depression. *J Neurophysiol* 86: 536-540.
- Kuhse J, Becker CM, Schmieden V, Hoch W, Pribilla I, Langosch D, Malosio ML, Muntz M, Betz H (1991a) Heterogeneity of the inhibitory glycine receptor. *Ann N Y Acad Sci* 625: 129-135.
- Kuhse J, Kuryatov A, Maulet Y, Malosio ML, Schmieden V, Betz H (1991b) Alternative splicing generates two isoforms of the alpha 2 subunit of the inhibitory glycine receptor. *FEBS Lett* 283: 73-77.
- Kulesza RJ, Jr., Spirou GA, Berrebi AS (2003) Physiological response properties of neurons in the superior paraolivary nucleus of the rat. *J Neurophysiol* 89: 2299-2312.
- Kullmann PH, Ene FA, Kandler K (2002) Glycinergic and GABAergic calcium responses in the developing lateral superior olive. *Eur J Neurosci* 15: 1093-1104.

- Kuwabara N, Zook JM (1991) Classification of the principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body. *J Comp Neurol* 314: 707-720.
- Kuwabara N, Zook JM (1992) Projections to the medial superior olive from the medial and lateral nuclei of the trapezoid body in rodents and bats. *J Comp Neurol* 324: 522-538.
- Kuwabara N, Zook JM (1999) Local collateral projections from the medial superior olive to the superior paraolivary nucleus in the gerbil. *Brain Res* 846: 59-71.
- Kuwabara N, DiCaprio RA, Zook JM (1991) Afferents to the medial nucleus of the trapezoid body and their collateral projections. *J Comp Neurol* 314: 684-706.
- Kuwada S, Batra R, Yin TC, Oliver DL, Haberly LB, Stanford TR (1997) Intracellular recordings in response to monaural and binaural stimulation of neurons in the inferior colliculus of the cat. *J Neurosci* 17: 7565-7581.
- Langford TL (1984) Responses elicited from medial superior olivary neurons by stimuli associated with binaural masking and unmasking. *Hear Res* 15: 39-50.
- Larkman AU, Major G, Stratford KJ, Jack JJ (1992) Dendritic morphology of pyramidal neurones of the visual cortex of the rat. IV. Electrical geometry. *J Comp Neurol* 323: 137-152.
- Laube B (2002) Potentiation of inhibitory glycinergic neurotransmission by  $Zn^{2+}$ : A synergistic interplay between presynaptic P2X2 and postsynaptic glycine receptors. *Eur J Neurosci* 16: 1025-1036.
- Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H (2002) Modulation of glycine receptor function: A novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci* 23: 519-527.
- Lay DM (1974) Differential predation on gerbils (*Meriones*) by the little owl, *Athene-Brama*. *J Mammal* 55: 608-614.
- Legendre P (1998) A reluctant gating mode of glycine receptor channels determines the time course of inhibitory miniature synaptic events in zebrafish hindbrain neurons. *J Neurosci* 18: 2856-2870.
- Legendre P (2001) The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 58: 760-793.
- Leibold C (2002) Die Rolle synaptischer Plastizität bei der zeitcodierten Schalllokalisation. Dissertation: Technische Universität München.
- Levy WB, Steward O (1983) Temporal contiguity requirements for long-term associative potentiation/depression in the hippocampus. *Neuroscience* 8: 791-797.
- Lichtman JW, Colman H (2000) Synapse elimination and indelible memory. *Neuron* 25: 269-278.



- Lim R, Alvarez FJ, Walmsley B (2000) GABA mediates presynaptic inhibition at glycinergic synapses in a rat auditory brainstem nucleus. *J Physiol (Lond)* 525: 447-459.
- Lin B, Martin PR, Solomon SG, Grunert U (2000) Distribution of glycine receptor subunits on primate retinal ganglion cells: A quantitative analysis. *Eur J Neurosci* 12: 4155-4170.
- Lindsey BG (1975) Fine structure and distribution of axon terminals from the cochlear nucleus on neurons in the medial superior olivary nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 160: 81-103.
- Lohmann C, Friauf E (1996) Distribution of the calcium-binding proteins parvalbumin and calretinin in the auditory brainstem of adult and developing rats. *J Comp Neurol* 367: 90-109.
- Lohof AM, Delhay-Bouchaud N, Mariani J (1996) Synapse elimination in the central nervous system: Functional significance and cellular mechanisms. *Rev Neurosci* 7: 85-101.
- Long GR, Schnitzler HU (1975) Behavioral audiograms from the bat, *Rhinolophus ferrumequinum*. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 100: 211-219.
- Loskota WJ, Lomax P, Verity MA (1974) A stereotaxic atlas of the Mongolian gerbil brain. Ann Arbor: Ann Arbor Science Publishers.
- Lu YM, Mansuy IM, Kandel ER, Roder J (2000) Calcineurin-mediated LTD of GABAergic inhibition underlies the increased excitability of CA1 neurons associated with LTP. *Neuron* 26: 197-205.
- Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998) A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587-591.
- Ludwig A, Zong X, Hofmann F, Biel M (1999) Structure and function of cardiac pacemaker channels. *Cell Physiol Biochem* 9: 179-186.
- Luhmann HJ, Reiprich RA, Hanganu I, Kilb W (2000) Cellular physiology of the neonatal rat cerebral cortex: Intrinsic membrane properties, sodium and calcium currents. *J Neurosci Res* 62: 574-584.
- Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P (2000) Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol (Lond)* 524: 91-116.
- Magee JC (1998) Dendritic hyperpolarization-activated currents modify the integrative properties of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 18: 7613-7624.

- Magee JC (1999) Dendritic Ih normalizes temporal summation in hippocampal CA1 neurons. *Nat Neurosci* 2: 508-514.
- Magee JC, Johnston D (1997) A synaptically controlled, associative signal for Hebbian plasticity in hippocampal neurons. *Science* 275: 209-213.
- Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H (1991a) Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 10: 2401-2409.
- Malosio ML, Grenningloh G, Kuhse J, Schmieden V, Schmitt B, Prior P, Betz H (1991b) Alternative splicing generates two variants of the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor. *J Biol Chem* 266: 2048-2053.
- Manis PB, Marx SO (1991) Outward currents in isolated ventral cochlear nucleus neurons. *J Neurosci* 11: 2865-2880.
- Margeta-Mitrovic M, Mitrovic I, Riley RC, Jan LY, Basbaum AI (1999) Immunohistochemical localization of GABA(B) receptors in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 405: 299-321.
- Markram H, Lubke J, Frotscher M, Sakmann B (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science* 275: 213-215.
- Marty A, Llano I (1995) Modulation of inhibitory synapses in the mammalian brain. *Curr Opin Neurobiol* 5: 335-341.
- Masterton B, Diamond IT (1967) Medial superior olive and sound localization. *Science* 155: 1696-1697.
- Masterton B, Heffner H, Ravizza R (1969) The evolution of human hearing. *J Acoust Soc Am* 45: 966-985.
- Masterton B, Thompson GC, Bechtold JK, RoBards MJ (1975) Neuroanatomical basis of binaural phase-difference analysis for sound localization: A comparative study. *J Comp Physiol Psychol* 89: 379-386.
- Matzenbach B, Maulet Y, Sefton L, Courtier B, Avner P, Guenet JL, Betz H (1994) Structural analysis of mouse glycine receptor alpha subunit genes. Identification and chromosomal localization of a novel variant. *J Biol Chem* 269: 2607-2612.
- McAlpine D, Grothe B (2003) Sound localisation and delay lines - do mammals fit the model? *Trends Neurosci* 26: 347-350.
- McAlpine D, Jiang D, Palmer AR (2001) A neural code for low-frequency sound localization in mammals. *Nat Neurosci* 4: 396-401.
- Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D (1995) Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron* 15: 563-572.

- Middlebrooks JC, Makous JC, Green DM (1989) Directional sensitivity of sound-pressure levels in the human ear canal. *J Acoust Soc Am* 86: 89-108.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16: 815-823.
- Miller KD (1994a) A model for the development of simple cell receptive fields and the ordered arrangement of orientation columns through activity-dependent competition between ON- and OFF-center inputs. *J Neurosci* 14: 409-441.
- Miller KD (1994b) Models of activity-dependent neural development. *Prog Brain Res* 102: 303-318.
- Miller KD, Keller JB, Stryker MP (1989) Ocular dominance column development: Analysis and simulation. *Science* 245: 605-615.
- Mitchell SJ, Silver RA (2000a) GABA spillover from single inhibitory axons suppresses low-frequency excitatory transmission at the cerebellar glomerulus. *J Neurosci* 20: 8651-8658.
- Mitchell SJ, Silver RA (2000b) Glutamate spillover suppresses inhibition by activating presynaptic mGluRs. *Nature* 404: 498-502.
- Moore JK (1987) The human auditory brain stem: A comparative view. *Hear Res* 29: 1-32.
- Moore JK, Moore RY (1971) A comparative study of the superior olivary complex in the primate brain. *Folia Primatol (Basel)* 16: 35-51.
- Moore JK, Osen KK, Storm-Mathisen J, Ottersen OP (1996) Gamma-aminobutyric acid and glycine in the baboon cochlear nuclei: An immunocytochemical colocalization study with reference to interspecies differences in inhibitory systems. *J Comp Neurol* 369: 497-519.
- Morest DK (1968a) The collateral system of the medial nucleus of the trapezoid body of the cat, its neuronal architecture and relation to the olivo-cochlear bundle. *Brain Res* 9: 288-311.
- Morest DK (1968b) The growth of synaptic endings in the mammalian brain: A study of the calyces of the trapezoid body. *Z Anat Entwicklungsgesch* 127: 201-220.
- Morishita W, Sastry BR (1993) Long-term depression of IPSPs in rat deep cerebellar nuclei. *Neuroreport* 4: 719-722.
- Moushegian G, Rupert A, Whitcomb MA (1964) Medial superior-olivary-unit response patterns to monaural and binaural clicks. *J Acoust Soc Am* 36: 196-202.
- Moushegian G, Rupert AL, Gidda JS (1975) Functional characteristics of superior olivary neurons to binaural stimuli. *J Neurophysiol* 38: 1037-1048.

- Neff WD, Hind JE (1955) Auditory thresholds of the cat. *J Acoust Soc Am* 27: 480-483.
- Nordeen KW, Killackey HP, Kitzes LM (1983) Ascending auditory projections to the inferior colliculus in the adult gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Comp Neurol* 214: 131-143.
- Numberger M, Draguhn A (1996) Patch-Clamp Technik. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Nyiri G, Freund TF, Somogyi P (2001) Input-dependent synaptic targeting of alpha(2)-subunit-containing GABA(A) receptors in synapses of hippocampal pyramidal cells of the rat. *Eur J Neurosci* 13: 428-442.
- O'Brien JA, Berger AJ (1999) Cotransmission of GABA and glycine to brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 82: 1638-1641.
- O'Leary DD, Ruff NL, Dyck RH (1994) Development, critical period plasticity, and adult reorganizations of mammalian somatosensory systems. *Curr Opin Neurobiol* 4: 535-544.
- Oda Y, Charpier S, Murayama Y, Suma C, Korn H (1995) Long-term potentiation of glycinergic inhibitory synaptic transmission. *J Neurophysiol* 74: 1056-1074.
- Oda Y, Kawasaki K, Morita M, Korn H, Matsui H (1998) Inhibitory long-term potentiation underlies auditory conditioning of goldfish escape behaviour. *Nature* 394: 182-185.
- Oertel D (1983) Synaptic responses and electrical properties of cells in brain slices of the mouse anteroventral cochlear nucleus. *J Neurosci* 3: 2043-2053.
- Oertel D (1999) The role of timing in the brain stem auditory nuclei of vertebrates. *Annu Rev Physiol* 61: 497-519.
- Okada M, Onodera K, Van Renterghem C, Sieghart W, Takahashi T (2000) Functional correlation of GABA(A) receptor alpha subunits expression with the properties of IPSCs in the developing thalamus. *J Neurosci* 20: 2202-2208.
- Oliver DL, Beckius GE, Shneiderman A (1995) Axonal projections from the lateral and medial superior olive to the inferior colliculus of the cat: A study using electron microscopic autoradiography. *J Comp Neurol* 360: 17-32.
- Oliver DL, Beckius GE, Bishop DC, Loftus WC, Batra R (2003) Topography of interaural temporal disparity coding in projections of medial superior olive to inferior colliculus. *J Neurosci* 23: 7438-7449.
- Ollo C, Schwartz IR (1979) The superior olivary complex in C57BL/6 mice. *Am J Anat* 155: 349-373.
- Olmsted JB (1986) Microtubule-associated proteins. *Annu Rev Cell Biol* 2: 421-457.

- Ornung G, Ottersen OP, Cullheim S, Ulfhake B (1998) Distribution of glutamate-, glycine- and GABA-immunoreactive nerve terminals on dendrites in the cat spinal motor nucleus. *Exp Brain Res* 118: 517-532.
- Osen KK (1969) Cytoarchitecture of the cochlear nuclei in the cat. *J Comp Neurol* 136: 453-484.
- Ouardouz M, Sastry BR (2000) Mechanisms underlying LTP of inhibitory synaptic transmission in the deep cerebellar nuclei. *J Neurophysiol* 84: 1414-1421.
- Overholt E, Rubel EW, Hyson RL (1992) A circuit for coding interaural time differences in the chick brainstem. *J Neurosci* 12: 1698-1708.
- Owens S, Forsythe ID (2000) Development and modulation of inhibitory synaptic transmission to medial superior olivary neurons. *Soc Neurosci Abstr* 26 (2): #637.4, p 1703.
- Paolini AG, FitzGerald JV, Burkitt AN, Clark GM (2001) Temporal processing from the auditory nerve to the medial nucleus of the trapezoid body in the rat. *Hear Res* 159: 101-116.
- Park TJ, Grothe B, Pollak GD, Schuller G, Koch U (1996) Neural delays shape selectivity to interaural intensity differences in the lateral superior olive. *J Neurosci* 16: 6554-6566.
- Park TJ, Monsivais P, Pollak GD (1997) Processing of interaural intensity differences in the LSO: Role of interaural threshold differences. *J Neurophysiol* 77: 2863-2878.
- Paxinos G, Watson C (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates*. San Diego: Academic Press.
- Perez Velazquez JL, Carlen PL (1996) Development of firing patterns and electrical properties in neurons of the rat ventrobasal thalamus. *Brain Res Dev Brain Res* 91: 164-170.
- Perkins RE (1973) An electron microscopic study of synaptic organization in the medial superior olive of normal and experimental chinchillas. *J Comp Neurol* 148: 387-415.
- Perrier JF, Hounsgaard J (2000) Development and regulation of response properties in spinal cord motoneurons. *Brain Res Bull* 53: 529-535.
- Pfeiffer F, Graham D, Betz H (1982) Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *J Biol Chem* 257: 9389-9393.
- Pfenninger K, Akert K, Moor H, Sandri C (1972) The fine structure of freeze-fractured presynaptic membranes. *J Neurocytol* 1: 129-149.

- Piechotta K, Weth F, Harvey RJ, Friauf E (2001) Localization of rat glycine receptor alpha1 and alpha2 subunit transcripts in the developing auditory brainstem. *J Comp Neurol* 438: 336-352.
- Pollak GD (1988) Time is traded for intensity in the bat's auditory system. *Hear Res* 36: 107-124.
- Pouille F, Scanziani M (2001) Enforcement of temporal fidelity in pyramidal cells by somatic feed-forward inhibition. *Science* 293: 1159-1163.
- Prior P, Schmitt B, Grenningloh G, Pribilla I, Multhaup G, Beyreuther K, Maulet Y, Werner P, Langosch D, Kirsch J, Betz H (1992) Primary structure and alternative splice variants of gephyrin, a putative glycine receptor-tubulin linker protein. *Neuron* 8: 1161-1170.
- Rager M (1999) Entwicklung einer Plastik-Dünnschnittmethode zur verbesserten Darstellung immunhistochemischer Markierungen in Kernen des auditorischen Stammhirns. Diplomarbeit: Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Rall W (1967) Distinguishing theoretical synaptic potentials computed for different somadendritic distributions of synaptic input. *J Neurophysiol* 30: 1138-1168.
- Ramon y Cajal S (1907) *Histologie du systeme nerveux de l'homme et des vertebrates*. Paris: Maloine.
- Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M (1996) Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* 75: 737-755.
- Rao RP, Sejnowski TJ (2001) Spike-timing-dependent Hebbian plasticity as temporal difference learning. *Neural Comput* 13: 2221-2237.
- Rao RP, Sejnowski TJ (2003) Self-organizing neural systems based on predictive learning. *Philos Transact Ser A Math Phys Eng Sci* 361: 1149-1175.
- Rathouz M, Trussell L (1998) Characterization of outward currents in neurons of the avian nucleus magnocellularis. *J Neurophysiol* 80: 2824-2835.
- Ravicz ME, Rosowski JJ, Voigt HF (1992) Sound-power collection by the auditory periphery of the Mongolian gerbil *Meriones unguiculatus*. I: Middle-ear input impedance. *J Acoust Soc Am* 92: 157-177.
- Rayleigh LJWS3BR (1907) On our perception of sound direction. *Philos Mag* 13: 214-232.
- Reyes A (2001) Influence of dendritic conductances on the input-output properties of neurons. *Annu Rev Neurosci* 24: 653-675.
- Reyes AD, Sakmann B (1996) Summation of synaptic potentials in layer V pyramidal neurons. *Soc Neurosci Abstr* 22 (1): #315.11, p 792.

- Reyes AD, Rubel EW, Spain WJ (1994) Membrane properties underlying the firing of neurons in the avian cochlear nucleus. *J Neurosci* 14: 5352-5364.
- Reyes AD, Rubel EW, Spain WJ (1996) In vitro analysis of optimal stimuli for phase-locking and time-delayed modulation of firing in avian nucleus laminaris neurons. *J Neurosci* 16: 993-1007.
- Rhode WS, Greenberg S (1994) Encoding of amplitude modulation in the cochlear nucleus of the cat. *J Neurophysiol* 71: 1797-1825.
- Rhode WS, Smith PH (1986) Encoding timing and intensity in the ventral cochlear nucleus of the cat. *J Neurophysiol* 56: 261-286.
- Rhode WS, Oertel D, Smith PH (1983a) Physiological response properties of cells labeled intracellularly with horseradish peroxidase in cat ventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 213: 448-463.
- Rhode WS, Smith PH, Oertel D (1983b) Physiological response properties of cells labeled intracellularly with horseradish peroxidase in cat dorsal cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 213: 426-447.
- Rietzel HJ, Friauf E (1998) Neuron types in the rat lateral superior olive and developmental changes in the complexity of their dendritic arbors. *J Comp Neurol* 390: 20-40.
- Riquelme R, Saldana E, Osen KK, Ottersen OP, Merchan MA (2001) Colocalization of GABA and glycine in the ventral nucleus of the lateral lemniscus in rat: An in situ hybridization and semiquantitative immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 432: 409-424.
- Roberts RC, Ribak CE (1987) GABAergic neurons and axon terminals in the brainstem auditory nuclei of the gerbil. *J Comp Neurol* 258: 267-280.
- Robinson DW, Wang GY (1998) Development of intrinsic membrane properties in mammalian retinal ganglion cells. *Semin Cell Dev Biol* 9: 301-310.
- Rogowski BA, Feng AS (1981) Normal postnatal development of medial superior olivary neurons in the albino rat: A Golgi and Nissl study. *J Comp Neurol* 196: 85-97.
- Rose JE, Brugge JF, Anderson DJ, Hind JE (1967) Phase-locked response to low-frequency tones in single auditory nerve fibers of the squirrel monkey. *J Neurophysiol* 30: 769-793.
- Rosowski JJ (1992) Hearing in transitional mammals: Predictions from the middle ear anatomy and hearing capabilities of extant mammals. In: *The evolutionary biology of hearing* (Webster DB, Fay RR, Popper AN, eds), pp 615-632. New York: Springer-Verlag.

- Rosowski JJ, Ravicz ME, Teoh SW, Flandermeyer D (1999) Measurements of middle-ear function in the Mongolian gerbil, a specialized mammalian ear. *Audiol Neurotol* 4: 129-136.
- Rothman JS, Manis PB (2003a) Differential expression of three distinct potassium currents in the ventral cochlear nucleus. *J Neurophysiol* 89: 3070-3082.
- Rothman JS, Manis PB (2003b) Kinetic analyses of three distinct potassium conductances in ventral cochlear nucleus neurons. *J Neurophysiol* 89: 3083-3096.
- Rothman JS, Manis PB (2003c) The roles potassium currents play in regulating the electrical activity of ventral cochlear nucleus neurons. *J Neurophysiol* 89: 3097-3113.
- Rothman JS, Young ED, Manis PB (1993) Convergence of auditory nerve fibers onto bushy cells in the ventral cochlear nucleus: Implications of a computational model. *J Neurophysiol* 70: 2562-2583.
- Rouiller EM, Cronin-Schreiber R, Fekete DM, Ryugo DK (1986) The central projections of intracellularly labeled auditory nerve fibers in cats: An analysis of terminal morphology. *J Comp Neurol* 249: 261-278.
- Rowland KC, Spirou GA (2001) Maturation of membrane electrical properties in gerbil medial superior olive. *Soc Neurosci Abstr* 27 (2): #725.6, p 1922.
- Rowland KC, Spirou GA (2002) Interactions of excitatory and inhibitory synaptic inputs in the MSO. *Assoc Res Otolaryngol Abs* 25: #24, p 6.
- Rowland KC, Irby NK, Spirou GA (2000) Specialized synapse-associated structures within the calyx of held. *J Neurosci* 20: 9135-9144.
- Ruiz-Gomez A, Vaello ML, Valdivieso F, Mayor F, Jr. (1991) Phosphorylation of the 48-kDa subunit of the glycine receptor by protein kinase C. *J Biol Chem* 266: 559-566.
- Russell FA, Moore DR (1995) Afferent reorganisation within the superior olivary complex of the gerbil: Development and induction by neonatal, unilateral cochlear removal. *J Comp Neurol* 352: 607-625.
- Russell FA, Moore DR (2002) Ultrastructural transynaptic effects of unilateral cochlear ablation in the gerbil medial superior olive. *Hear Res* 173: 43-61.
- Ryan A (1976) Hearing sensitivity of the mongolian gerbil, *Meriones unguiculatus*. *J Acoust Soc Am* 59: 1222-1226.
- Saberi K, Takahashi Y, Farahbod H, Konishi M (1999) Neural bases of an auditory illusion and its elimination in owls. *Nat Neurosci* 2: 656-659.



- Saint-Marie RL, Ostapoff EM, Morest DK, Wenthold RJ (1989) Glycine-immunoreactive projection of the cat lateral superior olive: Possible role in midbrain ear dominance. *J Comp Neurol* 279: 382-396.
- Sanchez C, Diaz-Nido J, Avila J (2000) Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* 61: 133-168.
- Sanes DH (1990) An in vitro analysis of sound localization mechanisms in the gerbil lateral superior olive. *J Neurosci* 10: 3494-3506.
- Sanes DH (1993) The development of synaptic function and integration in the central auditory system. *J Neurosci* 13: 2627-2637.
- Sanes DH, Rubel EW (1988) The ontogeny of inhibition and excitation in the gerbil lateral superior olive. *J Neurosci* 8: 682-700.
- Sanes DH, Siverls V (1991) Development and specificity of inhibitory terminal arborizations in the central nervous system. *J Neurobiol* 22: 837-854.
- Sanes DH, Takacs C (1993) Activity-dependent refinement of inhibitory connections. *Eur J Neurosci* 5: 570-574.
- Sanes DH, Merickel M, Rubel EW (1989) Evidence for an alteration of the tonotopic map in the gerbil cochlea during development. *J Comp Neurol* 279: 436-444.
- Sanes DH, Markowitz S, Bernstein J, Wardlow J (1992a) The influence of inhibitory afferents on the development of postsynaptic dendritic arbors. *J Comp Neurol* 321: 637-644.
- Sanes DH, Song J, Tyson J (1992b) Refinement of dendritic arbors along the tonotopic axis of the gerbil lateral superior olive. *Brain Res Dev Brain Res* 67: 47-55.
- Santoro B, Tibbs GR (1999) The HCN gene family: Molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels. *Ann N Y Acad Sci* 868: 741-764.
- Santoro B, Liu DT, Yao H, Bartsch D, Kandel ER, Siegelbaum SA, Tibbs GR (1998) Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717-729.
- Sassoe-Pognetto M, Wassle H, Grunert U (1994) Glycinergic synapses in the rod pathway of the rat retina: Cone bipolar cells express the alpha 1 subunit of the glycine receptor. *J Neurosci* 14: 5131-5146.
- Sassoe-Pognetto M, Kirsch J, Grunert U, Greferath U, Fritschy JM, Mohler, Betz H, Wassle H (1995) Colocalization of gephyrin and GABA<sub>A</sub>-receptor subunits in the rat retina. *J Comp Neurol* 357: 1-14.

- Sato K, Zhang JH, Saika T, Sato M, Tada K, Tohyama M (1991) Localization of glycine receptor alpha 1 subunit mRNA-containing neurons in the rat brain: An analysis using in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 43: 381-395.
- Sato K, Shiraishi S, Nakagawa H, Kuriyama H, Altschuler RA (2000) Diversity and plasticity in amino acid receptor subunits in the rat auditory brain stem. *Hear Res* 147: 137-144.
- Savander V, Go CG, Ledoux JE, Pitkanen A (1995) Intrinsic connections of the rat amygdaloid complex - projections originating in the basal nucleus. *J Comp Neurol* 361: 345-368.
- Schmidt S, Thaller J, Pötke M (1990) Behavioural audiogram and masked threshold in the free-tailed bat, *Tadarida brasiliensis*. In: *Brain-Perception-Cognition. Proc 18<sup>th</sup> Göttingen Neurob Conf* (Elsner N, Roth G, eds), p 146. Stuttgart: Thieme-Verlag.
- Schmitt B, Knaus P, Becker CM, Betz H (1987) The Mr 93,000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein. *Biochemistry* 26: 805-811.
- Schneider SP, Fyffe RE (1992) Involvement of GABA and glycine in recurrent inhibition of spinal motoneurons. *J Neurophysiol* 68: 397-406.
- Schofield BR (1995) Projections from the cochlear nucleus to the superior paraolivary nucleus in guinea pigs. *J Comp Neurol* 360: 135-149.
- Schofield BR, Cant NB (1991) Organization of the superior olivary complex in the guinea pig. I. Cytoarchitecture, cytochrome oxidase histochemistry, and dendritic morphology. *J Comp Neurol* 314: 645-670.
- Schofield BR, Cant NB (1992) Organization of the superior olivary complex in the guinea pig. II. Patterns of projection from the periolivary nuclei to the inferior colliculus. *J Comp Neurol* 317: 438-455.
- Schuett S, Bonhoeffer T, Hubener M (2001) Pairing-induced changes of orientation maps in cat visual cortex. *Neuron* 32: 325-337.
- Schwartz IR (1980) The differential distribution of synaptic terminals on marginal and central cells in the cat medial superior olivary nucleus. *Am J Anat* 159: 25-31.
- Schwartz IR (1992) The superior olivary complex and lateral lemniscal nuclei. In: *The mammalian auditory pathway: Neuroanatomy* (Webster DB, Popper AN, Fay RR, eds), pp 117-167. New York: Springer-Verlag.
- Schweizer H (1981) The connections of the inferior colliculus and the organization of the brainstem auditory system in the greater horseshoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*). *J Comp Neurol* 201: 25-49.

- Seidl AH, Grothe B (2003) Acoustic experience is essential for the development of normal ITD processing. *Assoc Res Otolaryngol Abs* 26: #930, p 235.
- Seifert R, Scholten A, Gauss R, Mincheva A, Lichter P, Kaupp UB (1999) Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9391-9396.
- Senn W (2002) Beyond spike timing: The role of nonlinear plasticity and unreliable synapses. *Biol Cybern* 87: 344-355.
- Senn W, Schneider M, Ruf B (2002) Activity-dependent development of axonal and dendritic delays, or, why synaptic transmission should be unreliable. *Neural Comput* 14: 583-619.
- Shinn-Cunningham BG, Santarelli S, Kopco N (2000) Tori of confusion: Binaural localization cues for sources within reach of a listener. *J Acoust Soc Am* 107: 1627-1636.
- Shneiderman A, Oliver DL, Henkel CK (1988) Connections of the dorsal nucleus of the lateral lemniscus: An inhibitory parallel pathway in the ascending auditory system? *J Comp Neurol* 276: 188-208.
- Simon JZ, Carr CE, Shamma SA (1999) A dendritic model of coincidence detection in the avian brainstem. *Neurocomputing* 26-7: 263-269.
- Singer JH, Talley EM, Bayliss DA, Berger AJ (1998) Development of glycinergic synaptic transmission to rat brain stem motoneurons. *J Neurophysiol* 80: 2608-2620.
- Skottun BC (1998) Sound localization and neurons. *Nature* 393: 531.
- Skottun BC, Shackleton TM, Arnott RH, Palmer AR (2001) The ability of inferior colliculus neurons to signal differences in interaural delay. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14050-14054.
- Smith AJ, Owens S, Forsythe ID (2000) Characterisation of inhibitory and excitatory postsynaptic currents of the rat medial superior olive. *J Physiol (Lond)* 529: 681-698.
- Smith KL, Szarowski DH, Turner JN, Swann JW (1995) Diverse neuronal populations mediate local circuit excitation in area CA3 of developing hippocampus. *J Neurophysiol* 74: 650-672.
- Smith PH (1995) Structural and functional differences distinguish principal from nonprincipal cells in the guinea pig MSO slice. *J Neurophysiol* 73: 1653-1667.
- Smith PH, Rhode WS (1987) Characterization of HRP-labeled globular bushy cells in the cat anteroventral cochlear nucleus. *J Comp Neurol* 266: 360-375.

- Smith PH, Joris PX, Carney LH, Yin TC (1991) Projections of physiologically characterized globular bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat. *J Comp Neurol* 304: 387-407.
- Smith PH, Joris PX, Yin TC (1993) Projections of physiologically characterized spherical bushy cell axons from the cochlear nucleus of the cat: Evidence for delay lines to the medial superior olive. *J Comp Neurol* 331: 245-260.
- Smith PH, Joris PX, Yin TC (1998) Anatomy and physiology of principal cells of the medial nucleus of the trapezoid body (MNTB) of the cat. *J Neurophysiol* 79: 3127-3142.
- Sommer I, Lingenhohl K, Friauf E (1993) Principal cells of the rat medial nucleus of the trapezoid body: An intracellular in vivo study of their physiology and morphology. *Exp Brain Res* 95: 223-239.
- Song YM, Huang LY (1990) Modulation of glycine receptor chloride channels by cAMP-dependent protein kinase in spinal trigeminal neurons. *Nature* 348: 242-245.
- Sontheimer H, Becker CM, Pritchett DB, Schofield PR, Grenningloh G, Kettenmann H, Betz H, Seeburg PH (1989) Functional chloride channels by mammalian cell expression of rat glycine receptor subunit. *Neuron* 2: 1491-1497.
- Spirou GA, Berrebi AS (1996) Organization of ventrolateral periolivary cells of the cat superior olive as revealed by pep-19 immunocytochemistry and nissl stain. *J Comp Neurol* 368: 100-120.
- Spirou GA, Berrebi AS (1997) Glycine immunoreactivity in the lateral nucleus of the trapezoid body of the cat. *J Comp Neurol* 383: 473-488.
- Spitzer MW, Semple MN (1995) Neurons sensitive to interaural phase disparity in gerbil superior olive: Diverse monaural and temporal response properties. *J Neurophysiol* 73: 1668-1690.
- Spoendlin H (1971) Degeneration behaviour of the cochlear nerve. *Arch Klin Exp Ohren Nasen Kehlkopfheilkd* 200: 275-291.
- Spruston N, Jaffe DB, Johnston D (1994) Dendritic attenuation of synaptic potentials and currents: The role of passive membrane properties. *Trends Neurosci* 17: 161-166.
- Stelzer A, Simon G, Kovacs G, Rai R (1994) Synaptic disinhibition during maintenance of long-term potentiation in the CA1 hippocampal subfield. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 3058-3062.
- Stotler WA (1953) An experimental study of the cells and connections of the superior olivary complex of the cat. *J Comp Neurol* 98: 401-432.
- Strominger NL, Hurwitz JL (1976) Anatomical aspects of the superior olivary complex. *J Comp Neurol* 170: 485-497.

- Stuart GJ, Redman SJ (1990) Voltage dependence of Ia reciprocal inhibitory currents in cat spinal motoneurons. *J Physiol (Lond)* 420: 111-125.
- Stuart G, Spruston N (1998) Determinants of voltage attenuation in neocortical pyramidal neuron dendrites. *J Neurosci* 18: 3501-3510.
- Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B (1993) Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Arch* 423: 511-518.
- Stuart G, Spruston N, Sakmann B, Hausser M (1997) Action potential initiation and backpropagation in neurons of the mammalian CNS. *Trends Neurosci* 20: 125-131.
- Stuhmer W, Ruppersberg JP, Schroter KH, Sakmann B, Stocker M, Giese KP, Perschke A, Baumann A, Pongs O (1989) Molecular basis of functional diversity of voltage-gated potassium channels in mammalian brain. *EMBO J* 8: 3235-3244.
- Suneja SK, Benson CG, Potashner SJ (1998a) Glycine receptors in adult guinea pig brain stem auditory nuclei: Regulation after unilateral cochlear ablation. *Exp Neurol* 154: 473-488.
- Suneja SK, Potashner SJ, Benson CG (1998b) Plastic changes in glycine and GABA release and uptake in adult brain stem auditory nuclei after unilateral middle ear ossicle removal and cochlear ablation. *Exp Neurol* 151: 273-288.
- Sur C, Triller A, Korn H (1995) Morphology of the release site of inhibitory synapses on the soma and dendrite of an identified neuron. *J Comp Neurol* 351: 247-260.
- Sutherland LC, Daigle GA (1997) Atmospheric sound propagation. In: *Encyclopedia of acoustics*, Vol. 1 (Crocker MJ, ed), pp 341-365. New York: Wiley-Interscience.
- Suwa H, Saint-Amant L, Triller A, Drapeau P, Legendre P (2001) High-affinity zinc potentiation of inhibitory postsynaptic glycinergic currents in the zebrafish hindbrain. *J Neurophysiol* 85: 912-925.
- Svirskis G, Rinzel J (2003) Influence of subthreshold nonlinearities on signal-to-noise ratio and timing precision for small signals in neurons: Minimal model analysis. *Network* 14: 137-150.
- Svirskis G, Kotak V, Sanes DH, Rinzel J (2002) Enhancement of signal-to-noise ratio and phase locking for small inputs by a low-threshold outward current in auditory neurons. *J Neurosci* 22: 11019-11025.
- Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H (1992) Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron* 9: 1155-1161.

- Tamas G, Buhl EH, Somogyi P (1997) Fast IPSPs elicited via multiple synaptic release sites by different types of GABAergic neurones in the cat visual cortex. *J Physiol (Lond)* 500: 715-738.
- Taschenberger H, von Gersdorff H (2000) Fine-tuning an auditory synapse for speed and fidelity: Developmental changes in presynaptic waveform, EPSC kinetics, and synaptic plasticity. *J Neurosci* 20: 9162-9173.
- Taschenberger H, Leao RM, Rowland KC, Spirou GA, von Gersdorff H (2002) Optimizing synaptic architecture and efficiency for high-frequency transmission. *Neuron* 36: 1127-1143.
- Thompson AM, Schofield BR (2000) Afferent projections of the superior olivary complex. *Microsc Res Tech* 51: 330-354.
- Thompson AM, Thompson GC (1991) Projections from the posteroventral cochlear nucleus to the superior olivary complex in guinea pig: Light and EM observations with the PHA-L method. *J Comp Neurol* 311: 495-508.
- Thompson SP (1882) On the function of the two ears in the perception of space. *Philos Mag* 13: 406-416.
- Todd AJ, Spike RC, Chong D, Neilson M (1995) The relationship between glycine and gephyrin in synapses of the rat spinal cord. *Eur J Neurosci* 7: 1-11.
- Todd AJ, Watt C, Spike RC, Sieghart W (1996) Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 16: 974-982.
- Tolbert LP, Morest DK, Yurgelun-Todd DA (1982) The neuronal architecture of the anteroventral cochlear nucleus of the cat in the region of the cochlear nerve root: Horseradish peroxidase labelling of identified cell types. *Neuroscience* 7: 3031-3052.
- Trahiotis C, Bernstein LR (1986) Lateralization of bands of noise and sinusoidally amplitude-modulated tones: Effects of spectral locus and bandwidth. *J Acoust Soc Am* 79: 1950-1957.
- Triller A, Korn H (1982) Transmission at a central inhibitory synapse. III. Ultrastructure of physiologically identified and stained terminals. *J Neurophysiol* 48: 708-736.
- Triller A, Korn H (1985) Activity-dependent deformations of presynaptic grids at central synapses. *J Neurocytol* 14: 177-192.
- Triller A, Cluzeaud F, Pfeiffer F, Betz H, Korn H (1985) Distribution of glycine receptors at central synapses: An immunoelectron microscopy study. *J Cell Biol* 101: 683-688.
- Triller A, Cluzeaud F, Korn H (1987) Gamma-aminobutyric acid-containing terminals can be apposed to glycine receptors at central synapses. *J Cell Biol* 104: 947-956.

- Triller A, Seitanidou T, Franksson O, Korn H (1990) Size and shape of glycine receptor clusters in a central neuron exhibit a somato-dendritic gradient. *New Biol* 2: 637-641.
- Triller A, Rostaing P, Korn H, Legendre P (1997) Morphofunctional evidence for mature synaptic contacts on the Mauthner cell of 52-hour-old zebrafish larvae. *Neuroscience* 80: 133-145.
- Trussell LO (1999) Synaptic mechanisms for coding timing in auditory neurons. *Annu Rev Physiol* 61: 477-496.
- Tucker RP, Matus AI (1988) Microtubule-associated proteins characteristic of embryonic brain are found in the adult mammalian retina. *Dev Biol* 130: 423-434.
- Uchizono K (1967) Synaptic organization of the Purkinje cells in the cerebellum of the cat. *Exp Brain Res* 4: 97-113.
- Valdivia O (1971) Methods of fixation and the morphology of synaptic vesicles. *J Comp Neurol* 142(3):257-73.
- Vater M (1995) Ultrastructural and immunocytochemical observations on the superior olivary complex of the mustached bat. *J Comp Neurol* 358: 155-180.
- Volgushev M, Vidyasagar TR, Chistiakova M, Eysel UT (2000) Synaptic transmission in the neocortex during reversible cooling. *Neuroscience* 98: 9-22.
- von Gersdorff H, Borst JG (2002) Short-term plasticity at the calyx of Held. *Nat Rev Neurosci* 3: 53-64.
- Wall MJ, Robert A, Howe JR, Usowicz MM (2002) The speeding of EPSC kinetics during maturation of a central synapse. *Eur J Neurosci* 15: 785-797.
- Wang RA, Randic M (1996) Alpha-subunit of CaM-KII increases glycine currents in acutely isolated rat spinal neurons. *J Neurophysiol* 75: 2651-2653.
- Warr WB (1966) Fiber degeneration following lesions in the anterior ventral cochlear nucleus of the cat. *Exp Neurol* 14: 453-474.
- Warr WB (1972) Fiber degeneration following lesions in the multipolar and globular cell areas in the ventral cochlear nucleus of the cat. *Brain Res* 40: 247-270.
- Watanabe T, Liao TT, Katsuki Y (1968) Neuronal response patterns in the superior olivary complex of the cat to sound stimulation. *Jpn J Physiol* 18: 267-287.
- Webster DB, Plassmann W (1992) Parallel evolution of low-frequency sensitivity in old world and new world desert rodents. In: *The evolutionary biology of hearing* (Webster DB, Fay RR, Popper AN, eds), pp 633-636. New York: Springer-Verlag.

- Webster DB, Webster M (1975) Auditory systems of Heteromyidae: Functional morphology and evolution of the middle ear. *J Morphol* 146: 343-376.
- Wentholt RJ, Huie D, Altschuler RA, Reeks KA (1987) Glycine immunoreactivity localized in the cochlear nucleus and superior olivary complex. *Neuroscience* 22: 897-912.
- Wentholt RJ, Parakkal MH, Oberdorfer MD, Altschuler RA (1988) Glycine receptor immunoreactivity in the ventral cochlear nucleus of the guinea pig. *J Comp Neurol* 276: 423-435.
- Wightman FL, Kistler DJ (1993) Sound Localization. In: Human psychophysics (Yost WA, Popper AN, Fay RR, eds), pp 155-192. New York: Springer-Verlag.
- Willard FH, Martin GF (1983) The auditory brainstem nuclei and some of their projections to the inferior colliculus in the North American opossum. *Neuroscience* 10: 1203-1232.
- Willard FH, Martin GF (1984) Collateral innervation of the inferior colliculus in the North American opossum: A study using fluorescent markers in a double-labeling paradigm. *Brain Res* 303: 171-182.
- Williams SR, Stuart GJ (2003) Voltage- and site-dependent control of the somatic impact of dendritic IPSPs. *J Neurosci* 23: 7358-7367.
- Winer JA, Larue DT (1999) Differential distribution of GABA<sub>B</sub>R1a/b immunoreactivity in the cat medial geniculate body. *Soc Neurosci Abstr* 25 (2): #571.16, p 1419.
- Withington-Wray DJ, Binns KE, Dhanjal SS, Brickley SG, Keating MJ (1990) The maturation of the superior collicular map of auditory space in the guinea pig is disrupted by developmental auditory deprivation. *Eur J Neurosci* 2: 693-703.
- Woodin MA, Ganguly K, Poo MM (2003) Coincident pre- and postsynaptic activity modifies GABAergic synapses by postsynaptic changes in Cl<sup>-</sup> transporter activity. *Neuron* 39: 807-820.
- Woolf NK, Ryan AF (1984) The development of auditory function in the cochlea of the mongolian gerbil. *Hear Res* 13: 277-283.
- Woolf NK, Ryan AF (1985) Ontogeny of neural discharge patterns in the ventral cochlear nucleus of the mongolian gerbil. *Brain Res* 349: 131-147.
- Wu SH, Kelly JB (1991) Physiological properties of neurons in the mouse superior olive: Membrane characteristics and postsynaptic responses studied in vitro. *J Neurophysiol* 65: 230-246.
- Xiang Z, Huguenard JR, Prince DA (2002) Synaptic inhibition of pyramidal cells evoked by different interneuronal subtypes in layer V of rat visual cortex. *J Neurophysiol* 88: 740-750.



- Xu TL, Li JS, Jin YH, Akaike N (1999) Modulation of the glycine response by  $\text{Ca}^{2+}$ -permeable AMPA receptors in rat spinal neurones. *J Physiol (Lond)* 514: 701-711.
- Xu TL, Dong XP, Wang DS (2000) N-methyl-D-aspartate enhancement of the glycine response in the rat sacral dorsal commissural neurons. *Eur J Neurosci* 12: 1647-1653.
- Yevenes GE, Peoples RW, Tapia JC, Parodi J, Soto X, Olate J, Aguayo LG (2003) Modulation of glycine-activated ion channel function by G-protein betagamma subunits. *Nat Neurosci* 6: 819-824.
- Yin TC (2002) Neural mechanisms of encoding binaural localization cues. In: Integrative functions in the mammalian auditory pathway (Oertel D, Fay RR, Popper AN, eds), pp 99-159. New York: Springer-Verlag.
- Yin TC, Chan JC (1990) Interaural time sensitivity in medial superior olive of cat. *J Neurophysiol* 64: 465-488.
- Young AB, Snyder SH (1973) Strychnine binding associated with glycine receptors of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 2832-2836.
- Young LL, Levine J (1977) Time-intensity trades revisited. *J Acoust Soc Am* 61: 607-609.
- Zhang DX, Li L, Kelly JB, Wu SH (1998a) GABAergic projections from the lateral lemniscus to the inferior colliculus of the rat. *Hear Res* 117: 1-12.
- Zhang LI, Tao HW, Holt CE, Harris WA, Poo M (1998b) A critical window for cooperation and competition among developing retinotectal synapses. *Nature* 395: 37-44.
- Zhao M, Wu SH (2001) Morphology and physiology of neurons in the ventral nucleus of the lateral lemniscus in rat brain slices. *J Comp Neurol* 433: 255-271.
- Zheng CM, Ito S, Minami S, Horikawa J, Murata K (1992) Frequency thresholds of rat cochlear nerve fibers. *Jpn J Physiol* 42: 459-472.
- Zook JM, Casseday JH (1982a) Cytoarchitecture of auditory system in lower brainstem of the mustache bat, *Pteronotus parnellii*. *J Comp Neurol* 207: 1-13.
- Zook JM, Casseday JH (1982b) Origin of ascending projections to inferior colliculus in the mustache bat, *Pteronotus parnellii*. *J Comp Neurol* 207: 14-28.

## 10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Benedikt Grothe für die Überlassung des interessanten Themas und für die andauernde, weitreichende und großzügige Unterstützung während der gesamten Arbeit sowie generell für die stimulierenden Diskussionen.

Bei Frau Dr. Ursula Koch möchte ich mich herzlich für die große Hilfe und die vielfältigen Diskussionen bei der Durchführung und Analyse der *in vitro* Experimente, sowie für das Lesen von Teilen dieser Arbeit und wertvolle Kommentare dazu, bedanken.

Ein spezieller Dank gilt den Mitgliedern des Thesis Committee Dr. Martin Korte und Prof. Hans Thoenen für gute Diskussionen und wertvolle Vorschläge zur Umsetzung dieser Arbeit.

Desweiteren möchte ich Herrn Gerhard Breutel für seine vielfältige Hilfe und für die Programmierung der DigiTrace-Software zur Quantifizierung der immunhistochemischen Daten danken.

Für die große Hilfe bei der Elektronenmikroskopie möchte ich mich bei Frau Dietmute Büringer und Frau Karin Brückner bedanken.

Herrn Armin H. Seidl danke ich für die gute Zusammenarbeit bei der immunhistochemischen Untersuchung der Ratten-MSO und bei der Elektronenmikroskopie.

Allen Mitgliedern der Abteilung Bonhoeffer und natürlich der Arbeitsgruppe Grothe – Dr. Anna K. Magnusson, Dr. Antje Brand, Armin H. Seidl, Ida Kollmar, Marianne Braun, Dr. Sylvie Baudoux, Dr. Ursula Koch – danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, die vielen wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen und eine Menge Spaß.

Für das Korrekturlesen der Arbeit und die Beseitigung von Kommafehlern möchte ich mich herzlich bei Frau Andrea Garbereder bedanken.

Bei meiner Familie möchte ich mich herzlich für die großzügige Unterstützung und die vielfältige Hilfe bedanken.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei meiner Claudia bedanken, dafür dass sie mich die letzten Monate ertragen hat, mir viele Probleme abnahm und mich während der ganzen Zeit in allen Belangen unterstützt hat.

## 11 Lebenslauf

<b>Name:</b>	Kapfer
<b>Vorname:</b>	Christoph
<b>Geburtsort:</b>	Augsburg
<b>Geburtstag:</b>	22. Februar 1971
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	Deutsch
1977 – 1981	Goethe Grundschule, Gersthofen
1981 – 1990	Paul-Klee Gymnasium, Gersthofen
1990	Abitur
1990 – 1992	Zivildienst, Altentagespflege des BRK Augsburg-Stadt
1992	Studium der Physik an der Universität Augsburg
1992 – 1993	Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1994 – 1999	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1997	Diplomhauptprüfungen in den Fächern Neurobiologie (Hauptfach), Zoologie, Ökologie, Botanik
1998 – 1999	Diplomarbeit im Fach Biologie am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München am Lehrstuhl von Prof. Dr. G. Neuweiler im Labor von PD Dr. B. Grothe Thema: Aktivitätsabhängige Restriktion inhibitorischer Eingänge zu auditorischen Neuronen
1999 – 2002	Promotionsstudiengang Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München
1999 – 2003	Dissertation in der Arbeitsgruppe „Auditorische Physiologie“ von PD Dr. B. Grothe am Max-Planck-Institut für Neurobiologie in Martinsried

### Publikationen

- Kapfer C, Seidl AH, Schweizer H, Grothe B (2002) Experience-dependent refinement of inhibitory inputs to auditory coincidence-detector neurons. *Nat Neurosci* 5 (3): 247-253
- Behrend O, Brand A, Kapfer C, Grothe B (2002) Temporal processing in the superior paraolivary nucleus. *J Neurophysiol* 87 (6): 2915-2928

## 12 Erklärung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel durchgeführt wurde.

München, den 24.11.2003

---

Christoph Kapfer